



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

(21) BR 112020021949-5 A2



(22) Data do Depósito: 26/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 26/01/2021

(54) Título: LIGANTES DIRIGIDOS À INTEGRINA E SEUS USOS

(51) Int. Cl.: A61K 38/17; C07K 14/705.

(30) Prioridade Unionista: 09/01/2019 US 62/790,372; 27/04/2018 US 62/663,763.

(71) Depositante(es): ARROWHEAD PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): ZHEN LI; JEFFREY CARLSON; ANTHONY NICHOLAS; XIAOKAI LI; DONGXU SHU; MATTHEW FOWLER-WATTERS.

(86) Pedido PCT: PCT US2019029393 de 26/04/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/210200 de 31/10/2019

(85) Data da Fase Nacional: 27/10/2020

(57) Resumo: LIGANTES DIRIGIDOS À INTEGRINA E SEUS USOS. São descritos compostos com afinidade por integrinas, a síntese destes compostos e o uso destes compostos como ligantes para facilitar a entrega de moléculas transportadoras a células expressando integrinas. Os ligantes dirigidos à integrina têm estabilidade de soro e afinidade com a integrina av β 3 e/ou av β 5 e são adequados para conjugação com moléculas transportadoras, como agentes terapêuticos baseados em oligonucleotídeos (p. ex., agentes de RNAi), para facilitar a entrega das moléculas transportadora a células e tecidos, como células tumorosas, que expressam integrina av β 3, av β 5 ou ambas as integrinas av β 3 e av β 5. Também são descritas composições que incluem ligantes dirigidos à integrina e métodos de uso.

LIGANTES DIRIGIDOS À INTEGRINA E SEUS USOS

REFERÊNCIA CRUZADA PARA PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica a prioridade dos Pedidos de Patente Provisória dos EUA N° 62/663.763, solicitado em 27 de abril de 2018, e 62/790.372, solicitado em 9 de janeiro de 2019, cujas totalidades são incorporadas por referência aqui.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] Aqui são divulgados compostos com afinidade para integrinas, métodos de síntese de tais compostos e o uso de tais compostos como ligantes para entregar moléculas transportadoras *in vivo*.

CONTEXTO

[0003] As integrinas são glicoproteínas transmembrana que servem como mediador das interações célula-célula e célula-matriz. As integrinas alfa-v beta-3 ($\alpha v \beta 3$) e alfa-v beta-5 ($\alpha v \beta 5$) são membros da superfamília de integrinas de moléculas de adesão e são conhecidas por serem receptores para a proteína vitronectina da matriz extracelular (ECM). (Horton, MA, 29(5) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 721-725 (1997)). Acredita-se que a expressão alterada de certas integrinas, incluindo as integrinas $\alpha v \beta 3$ e $\alpha v \beta 5$, contribua para a progressão, invasividade e metástases de tumor.

[0004] De fato, a superexpressão de integrinas, incluindo as integrinas $\alpha v \beta 3$ e $\alpha v \beta 5$, foi encontrada em muitas células

tumoriais. (Desgrosellier, JS et al., *Nat Rev Cancer*, 10(1):9-22 (2010)). Antagonistas de $\alpha v\beta 3$ (e de $\alpha v\beta 5$, em menor extensão) foram considerados para uso em uma variedade de doenças associadas à função alterada da integrina. Por exemplo, foram feitas tentativas para desenvolver inibidores de $\alpha v\beta 3$ como possíveis tratamentos de câncer, uma vez que a inibição do receptor $\alpha v\beta 3$ demonstrou ser inibidora da angiogênese, evitando assim a formação de novos vasos sanguíneos que se acredita que sejam necessários para o crescimento do tumor. (Consulte, p. ex., Brooks et al., *79 Cell* 1157-1164 (1994); Mas-Moruno et al., *Anticancer Agents Med Chem*, 10(10):753-768). No entanto, um exemplo importante de um inibidor $\alpha v\beta 3$, o antagonista Cilengitida, demonstrou não ser eficaz em ensaios clínicos que visam a limitação da angiogênese e da progressão tumoral em pacientes com glioblastoma. (Consulte, p. ex., Ley et al., *Integrin-based Therapeutics: Biological Basis, Clinical Use and New Drugs*, 15(3) *Nat. Rev. Drug Discov.* 173-183 (2016)).

[0005] Em geral, a entrega de moléculas transportadoras *in vivo*, incluindo compostos farmacêuticos terapeuticamente eficazes ou ingredientes farmacêuticos ativos, a células e/ou tecidos desejados continua sendo um desafio geral no desenvolvimento de medicamentos terapeuticamente viáveis. Continua a existir uma necessidade de compostos dirigidos estabelecer eficazes que tenham afinidade e/ou sejam capazes de ligar-se de maneira seletiva a células e tecidos

específicos, que podem ser utilizados ou empregados como ligantes para facilitar a entrega de moléculas terapêuticas transportadoras a essas células ou tecidos específicos. Além disso, existe uma necessidade específica de compostos que sejam capazes de visar de maneira seletiva a integrina alfa-v beta-3 e que sejam adequados para serem conjugados com moléculas transportadoras e entregar estas moléculas às células que expressam tais integrinas, tais como células tumorais, *in vivo*. Para oligonucleotídeos e terapêuticas baseadas em oligonucleotídeos em especial (p. ex., um composto baseado em oligonucleotídeos como um oligonucleotídio antissentido ou um agente de RNAi), continua a existir uma necessidade de ligantes capazes de visar a integrina alfa-v beta-3 e/ou integrina alfa-v beta-5 e facilitar a entrega destes compostos baseados em oligonucleotídeos às células que expressam tais integrinas.

RESUMO DA INVENÇÃO

[0006] Estão descritos aqui compostos com afinidade para certas integrinas, incluindo $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$, que podem ser empregados como ligantes (referidos aqui como "ligantes dirigidos à integrina", "ligantes dirigidos à integrina $\alpha v\beta 3$ ", "ligantes de integrina $\alpha v\beta 3$ " ou simplesmente "ligantes de integrina") para visar seletivamente compostos ou outras moléculas às quais eles estão ligados a células ou tecidos que expressam integrina $\alpha v\beta 3$ e/ou $\alpha v\beta 5$. Os ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui são estáveis em soro,

além de terem afinidade e poderem se ligar com especificidade a estas integrinas. Os ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui podem ser conjugados com molécula(s) transportadora(s) para facilitar a entrega da(s) molécula(s) transportadora(s) a células ou tecidos com expressão das integrinas $\alpha v\beta 3$ e/ou $\alpha v\beta 5$.

[0007] Em outro aspecto, aqui estão descritos métodos de entrega de uma molécula transportadora a um tecido e/ou célula que expressa integrina $\alpha v\beta 3$ e/ou integrina $\alpha v\beta 5$ *in vivo*, em que os métodos incluem a administração a um participante de pesquisa de um ou mais ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui que tenham sido conjugados com uma ou mais moléculas transportadoras. Aqui ainda são divulgados métodos de tratamento de um participante do estudo com doença, sintoma ou transtorno para o qual a entrega de uma molécula terapêutica transportadora (por exemplo, um ingrediente farmacêutico ativo) para uma célula expressando as integrinas $\alpha v\beta 3$ e/ou $\alpha v\beta 5$ é capaz de tratar o participante, caracterizado por métodos que incluem a administração (a um participante) de um ou mais ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui, conjugados com uma ou mais moléculas terapêuticas transportadoras.

[0008] Aqui também são descritos métodos de inibição da expressão de um gene-alvo em uma célula *in vitro* ou *in vivo*, em que os métodos incluem a administração à célula de uma quantidade eficaz de conjugado, incluindo um ou mais ligantes

dirigidos à integrina divulgados aqui que foram conjugados com uma ou mais terapêuticas baseadas em oligonucleotídeos, tais como um agente de RNAi, capazes de inibir a expressão de um gene-alvo em uma célula. Em algumas modalidades, aqui estão descritos métodos de inibição da expressão de um gene-alvo em uma célula de um participante do estudo, em que o participante do estudo é administrado com uma quantidade eficaz de uma ou mais terapêuticas à base de oligonucleotídeos (como um agente de RNAi) que foram conjugados com um ou mais ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui.

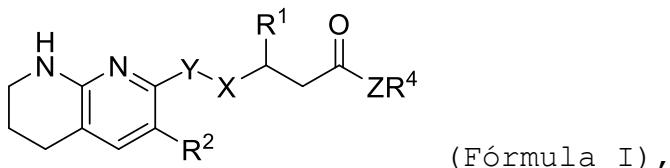
[0009] Em ainda outro aspecto, aqui são descritas composições que incluem os ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui. As composições descritas aqui podem ser composições farmacêuticas ou medicamentos que incluem um ou mais ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui e conjugados com uma ou mais moléculas transportadoras terapêuticas, tais como um agente de RNAi ou outra molécula transportadora ou substância terapêutica.

[0010] Em algumas modalidades, aqui estão descritos métodos de tratamento de um participante do estudo com uma doença ou transtorno mediado pelo menos em parte pela expressão de um gene-alvo em uma célula que expressa integrina $\alpha v \beta 3$, em que os métodos incluem a administração a um participante necessitando de um quantidade de uma composição farmacêutica, em que a composição farmacêutica

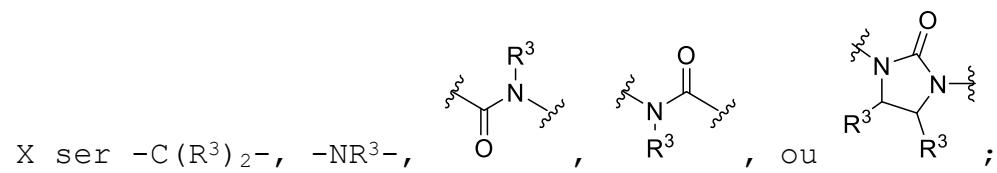
inclui uma ou mais terapêuticas à base dos oligonucleotídeos capazes de inibir a expressão de um gene-alvo, tal como um agente de RNAi, que é conjugado com um ou mais ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui. Em algumas modalidades, aqui estão descritos métodos de tratamento de um participante do estudo com uma doença ou transtorno mediado pelo menos em parte pela expressão de um gene-alvo em uma célula tumoral, em que os métodos incluem a administração a um participante do estudo em necessidade de uma quantidade eficaz de um composição farmacêutica, em que a composição farmacêutica inclui uma ou mais terapêuticas à base de oligonucleotídeos capazes de inibir a expressão de um gene-alvo, como um agente de RNAi, conjugado com um ou mais ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui. Em algumas modalidades, aqui estão descritos métodos de tratamento de um participante do estudo com uma doença ou transtorno mediado pelo menos em parte pela expressão de um gene-alvo em uma célula tumoral renal, como uma célula tumoral de carcinoma renal de células claras, em que os métodos incluem a administração a um participante necessitando de uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica, em que a composição farmacêutica inclui uma ou mais terapêuticas à base de oligonucleotídeos capazes de inibir a expressão de um gene-alvo, tal como um agente de RNAi, conjugado com um ou mais ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui.

[0011] Em um primeiro aspecto, esta divulgação oferece ligantes sintéticos dirigidos à integrina.

[0012] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui inclui a estrutura da seguinte fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, caracterizado por,



Y ser um alquíleno C_1-C_8 substituído facultativamente;

Z ser O, NR³ ou S;

n ser um número inteiro de 1 a 8;

R¹ ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R¹ compreender uma molécula transportadora;

R² ser H, um alquil substituído facultativamente ou R² compreender uma molécula transportadora;

cada instância de R³ ser selecionada de maneira independente a partir do grupo consistindo em H e um alquil

substituído facultativamente ou R³ compreender uma molécula transportadora;

R⁴ ser H ou um alquil substituído facultativamente; e caracterizado por pelo menos um de Y, R¹, R², qualquer instância de R³ e R⁴ compreender uma molécula transportadora.

[0013] Qualquer um dos ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui pode ser ligado a uma molécula transportadora, um grupo reativo e/ou um grupo reativo protegido. A ligação a um grupo reativo, por exemplo, pode ser usada para facilitar a conjugação do ligante dirigido à integrina a uma molécula transportadora. Os ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui podem aumentar a direção de uma molécula transportadora para uma célula que expressa uma integrina, incluindo as integrinas αvβ3 e/ou αvβ5. Uma molécula transportadora pode ser, mas não está limitada a isso, um ingrediente ou composto farmaceuticamente ativo, um profármaco ou outra substância com benefício terapêutico conhecido. Em algumas modalidades, uma molécula transportadora pode ser, mas não está limitada a isso, uma pequena molécula, um anticorpo, um fragmento de anticorpo, uma imunoglobulina, um anticorpo monoclonal, um rótulo ou marcador, um lipídio, um oligonucleotídeo natural ou modificado, um composto modificado à base de oligonucleotídios (por exemplo, um oligonucleotídeo antissentido ou um agente de RNAi), um ácido nucleico natural

ou modificado, um peptídeo, um aptâmero, um polímero, uma poliamina, uma proteína, uma toxina, uma vitamina, um polietilenoglicol, um hapteno, uma digoxigenina, uma biotina, um átomo ou molécula radioativa ou um fluoróforo. Em algumas modalidades, uma molécula transportadora inclui um ingrediente farmaceuticamente ativo ou um pró-fármaco. Em algumas modalidades, uma molécula transportadora é ou inclui um agente terapêutico à base de oligonucleotídios, como um composto antissetido ou um agente de RNAi. Em algumas modalidades, uma molécula transportadora é ou inclui um composto à base de oligonucleotídios que é um ingrediente farmaceuticamente ativo. Em algumas modalidades, uma molécula transportadora é ou inclui um agente de RNAi que é um ingrediente farmaceuticamente ativo.

[0014] É descrito aqui o uso dos ligantes dirigidos à integrina $\alpha v \beta 3/5$ descritos para visar e entregar uma molécula transportadora a uma célula que expressa integrinas. A molécula transportadora pode ser entregue a uma célula *in vitro*, *in situ*, *ex vivo* ou *in vivo*.

[0015] Em outro aspecto, esta divulgação fornece composições que incluem um ou mais dos ligantes dirigidos à integrina descritos aqui. Por exemplo, em algumas modalidades, as composições que compreendem um ou mais ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui incluem um ou mais compostos à base de oligonucleotídios, como um ou mais agentes de RNAi, a serem entregues a uma célula *in vivo*. Em

algumas modalidades, são descritas aqui composições para a entrega de um agente de RNAi a uma célula *in vivo*, em que o agente de RNAi está ligado a um ou mais ligantes dirigidos à integrina.

[0016] São descritas as composições que incluem um ou mais ligantes dirigidos à integrina. Em algumas modalidades, uma composição compreende um excipiente farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, uma composição que inclui um ou mais ligantes dirigidos à integrina compreende uma ou mais substâncias farmacêuticas ou ingredientes ou compostos farmaceuticamente ativos. Em algumas modalidades, são descritas aqui as composições que incluem um ou mais ligantes dirigidos à integrina.

[0017] As composições que incluem um ou mais ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui podem ser entregues *in vivo* ou *in vitro* a várias células cancerosas, incluindo, por exemplo, células tumorais de carcinoma renal de células claras (p. ex., A498), outras células de câncer renal (p. ex., ACHN, CAKI -2, 769-P, 786-O), células de melanoma (p. ex., A375), células de glioblastoma (p. ex., U87MG), células de câncer pancreático (p. ex., (PANC-1), células de câncer de pulmão (p. ex., H460, H661, H1573, H2126), células de câncer de cólon (p. ex., HT29, HCT116), células de câncer de fígado (p. ex., Hep2G, Hep3B), células de câncer de mama (p. ex., MCF7, SK-BR3), células de câncer de próstata (p. ex., DU1 45, PC3, LNCaP, MDA-PCa-2b), células de câncer de boca

(p. ex., KB), células de câncer de língua (p. ex., CAL27, SCC9), células de câncer de faringe (p. ex., Detroit562) e/ou células de câncer de ovário (p. ex., OVCAR3, SKOV3, A2780) e/ou outros xenenxertos derivados do paciente.

[0018] Em outro aspecto, a presente divulgação fornece métodos que incluem o uso de um ou mais ligantes dirigidos à integrina e/ou composições como descrito aqui e, se desejado, trazer os ligantes dirigidos à integrina e/ou composições em uma forma adequada para administração como produto farmacêutico. Em outras modalidades, a divulgação fornece métodos para a fabricação dos ligantes e composições, p. ex., medicamentos, aqui descritos.

[0019] As composições que incluem um ou mais ligantes dirigidos à integrina podem ser administradas a indivíduos *in vivo* usando vias de administração conhecidas na técnica como adequadas para tal administração, em vista da molécula transportadora que se busca administrar, incluindo, por exemplo, por administração subcutânea, intravenosa, intratumoral, inalada (formulações de aerossol ou pó seco), intranasal, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, oral, sublingual ou tópica. Em algumas modalidades, as composições que incluem um ou mais ligantes dirigidos à integrina podem ser administradas para entrega sistêmica, por exemplo, por administração intravenosa ou subcutânea.

[0020] Em algumas modalidades, são divulgados aqui métodos para entregar uma ou mais moléculas transportadoras

desejadas a uma célula tumoral de carcinoma renal de células claras *in vivo*, em que os métodos incluem a administração ao participante do estudo de um ou mais ligantes dirigidos à integrina conjugados com um ou mais cargas moléculas.

[0021] Em algumas modalidades, são divulgados aqui métodos de entrega de um composto baseado em oligonucleotídeos a uma célula tumoral *in vivo*, em que os métodos incluem a administração ao participante do estudo de um ou mais ligantes dirigidos à integrina conjugados com um ou mais compostos baseados em oligonucleotídeos. Em algumas modalidades, são divulgados aqui métodos de entrega de um agente de RNAi a uma célula tumoral *in vivo*, em que os métodos incluem a administração ao participante do estudo de um ou mais ligantes dirigidos à integrina conjugados com um ou mais agentes de RNAi. Em algumas modalidades, são divulgados aqui métodos de inibir a expressão de um gene-alvo em uma célula tumoral de carcinoma renal de células claras *in vivo*, em que os métodos incluem a administração ao participante do estudo de um agente de RNAi conjugado com um ou mais ligantes com afinidade para as integrinas $\alpha v\beta 3$ e/ou $\alpha v\beta 5$.

[0022] Outros objetos, características, aspectos e vantagens da invenção ficarão em evidência a partir da seguinte descrição detalhada e das reivindicações.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

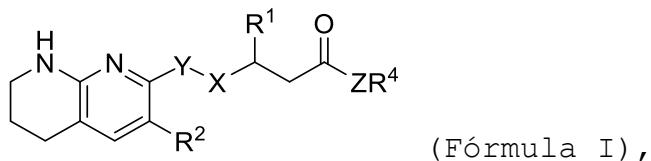
Ligantes dirigidos à integrina

[0023] Estão descritos aqui compostos com afinidade para integrinas, que exibem estabilidade no soro *in vivo* e podem ser usados como ligantes para facilitar a entrega de moléculas transportadoras para células e/ou tecidos que expressam integrinas, tais como integrina $\alpha v\beta 3$ e/ou integrina $\alpha v\beta 5$. Os ligantes dirigidos à integrina podem ser usados para visar células que expressam integrinas *in vitro*, *in situ*, *ex vivo* e/ou *in vivo*.

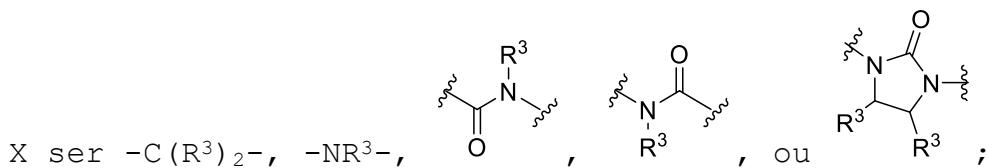
[0024] Em algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui podem ser conjugados com uma ou mais moléculas transportadoras para direcionar e visar preferencialmente as moléculas transportadoras para células ou tecidos que expressam integrinas, incluindo integrina $\alpha v\beta 3$ e/ou integrina $\alpha v\beta 5$. Em algumas modalidades, as moléculas transportadoras incluem ou consistem em compostos farmaceuticamente ativos. Em algumas modalidades, as moléculas transportadoras incluem ou consistem em compostos à base de oligonucleotídeos, como agentes de RNAi. Em algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui são conjugados com moléculas transportadoras para direcionar as moléculas transportadoras para células tumorais *in vivo*. Em algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui são conjugados com moléculas transportadoras para direcionar as moléculas transportadoras para células tumorais de carcinoma renal de células claras *in vivo*.

Fórmula I

[0025] Em um aspecto, a invenção fornece ligantes de integrina da estrutura:



caracterizado por



Y ser um alquíleno substituído facultativamente;

Z ser O, NR³ ou S;

n ser um número inteiro de 1 a 8;

R¹ ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R¹ compreender uma molécula transportadora;

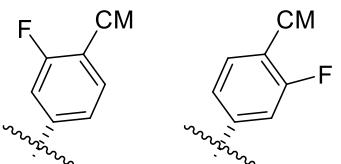
R² ser H, um alquil substituído facultativamente ou R² compreender uma molécula transportadora;

cada instância de R³ ser selecionada de maneira independente a partir do grupo consistindo em H e um alquil substituído facultativamente ou R³ compreender uma molécula transportadora;

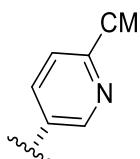
R⁴ ser H ou um alquil substituído facultativamente; e

caracterizado por pelo menos um de Y, R¹, R², qualquer instância de R³ e R⁴ compreender uma molécula transportadora.

[0026] Em algumas modalidades da Fórmula I, R¹ é



selecionado do grupo que consiste em:

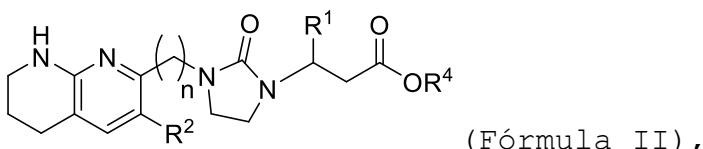


, caracterizado por \S indicar o ponto de fixação e CM compreende uma molécula transportadora.

[0027] Em algumas modalidades da Fórmula I, Y é um alquíleno C₁ a C₆;.

Fórmula II

[0028] Em algumas modalidades da Fórmula I, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui inclui a estrutura da seguinte fórmula:



Ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, caracterizado por

n ser um número inteiro de 1 a 8;

R¹ ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído

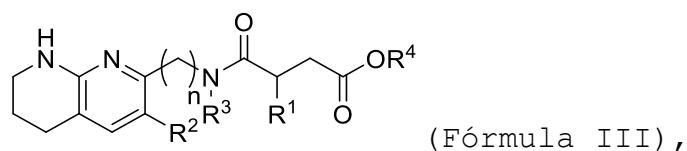
facultativamente ou R^1 compreender uma molécula transportadora;

R^2 ser H, um alquil substituído facultativamente ou R^2 compreender uma molécula transportadora;

R^4 ser H ou um alquil substituído facultativamente; e caracterizado por pelo menos um de R^1 ou R^2 compreender uma molécula transportadora.

Fórmula III

[0029] Em algumas modalidades da Fórmula I, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui inclui a estrutura da seguinte fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, caracterizado por

n ser um número inteiro de 1 a 8;

R^1 ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R^1 compreender uma molécula transportadora;

R^2 ser H, um alquil substituído facultativamente ou R^2 compreender uma molécula transportadora;

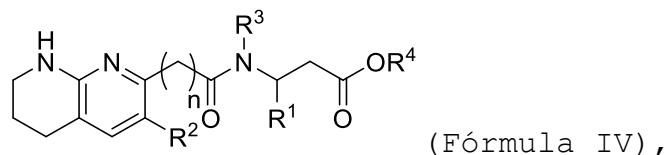
R^3 ser selecionado de maneira independente a partir do grupo consistindo em H e um alquil substituído

facultativamente ou R^3 compreender uma molécula transportadora;

R^4 ser H ou um alquil substituído facultativamente; e caracterizado por pelo menos um de R^1 , R^2 ou R^3 compreender uma molécula transportadora.

Fórmula IV

[0030] Em algumas modalidades da Fórmula I, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui inclui a estrutura da seguinte fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, caracterizado por

n ser um número inteiro de 1 a 8;
 R^1 ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R^1 compreender uma molécula transportadora;

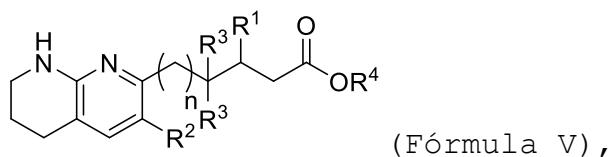
R^2 ser H, um alquil substituído facultativamente ou R^2 compreender uma molécula transportadora;

R^3 ser selecionado de maneira independente a partir do grupo consistindo em H e um alquil substituído facultativamente ou R^3 compreender uma molécula transportadora;

R^4 ser H ou um alquil substituído facultativamente; e caracterizado por pelo menos um de R^1 , R^2 ou R^3 compreender uma molécula transportadora.

Fórmula V

[0031] Em algumas modalidades da Fórmula I, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui inclui a estrutura da seguinte fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, caracterizado por

n ser um número inteiro de 1 a 8;

R^1 ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R^1 compreender uma molécula transportadora;

R^2 ser H, um alquil substituído facultativamente ou R^2 compreender uma molécula transportadora;

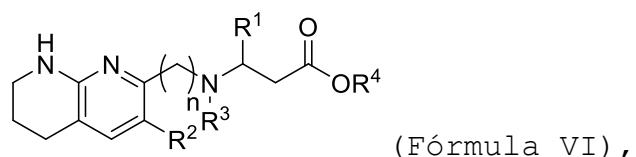
cada instância de R^3 ser selecionada de maneira independente a partir do grupo consistindo em H e um alquil substituído facultativamente ou R^3 compreender uma molécula transportadora;

R^4 ser H ou um alquil substituído facultativamente; e

caracterizado por pelo menos um de R¹, R² ou R³ compreender uma molécula transportadora.

Fórmula VI

[0032] Em algumas modalidades da Fórmula I, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui inclui a estrutura da seguinte fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, caracterizado por

n ser um número inteiro de 1 a 8;

R¹ ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R¹ compreender uma molécula transportadora;

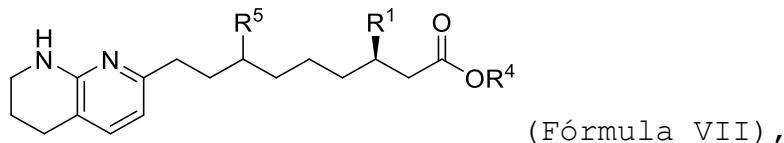
R² ser H, um alquil substituído facultativamente ou R² compreender uma molécula transportadora;

cada instância de R³ ser selecionada de maneira independente a partir do grupo consistindo em H e um alquil substituído facultativamente ou R³ compreender uma molécula transportadora;

R⁴ ser H ou um alquil substituído facultativamente; e caracterizado por pelo menos um de R¹, R² ou R³ compreender uma molécula transportadora.

Fórmula VII

[0033] Em algumas modalidades da Fórmula I, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui inclui a estrutura da seguinte fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, caracterizado por

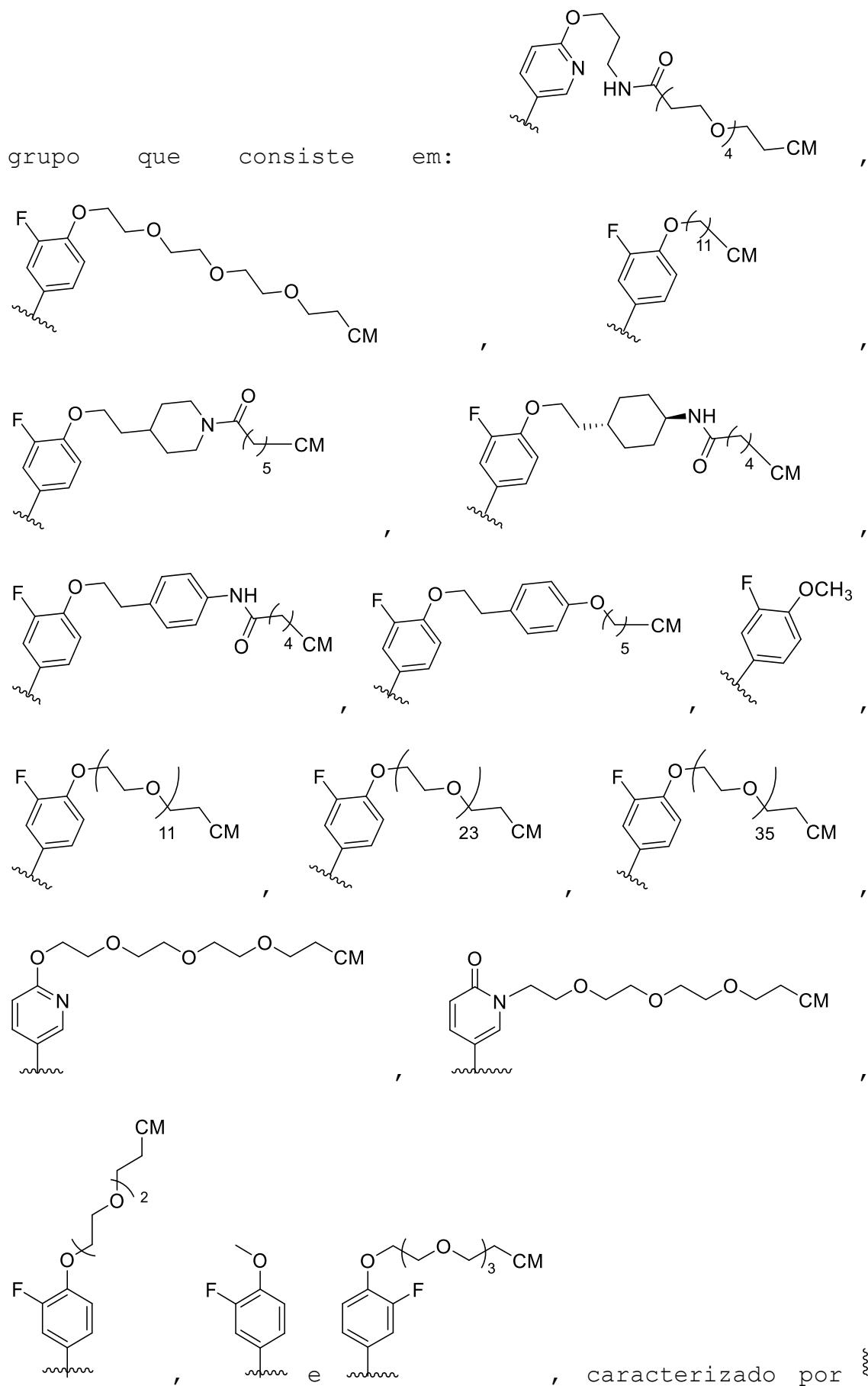
R¹ ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R¹ compreender uma molécula transportadora;

R² ser H, um alquil substituído facultativamente ou R² compreender uma molécula transportadora;

R⁴ ser H ou um alquil substituído facultativamente; e caracterizado por pelo menos um de R¹, R⁴ ou R⁵ compreender uma molécula transportadora.

R¹

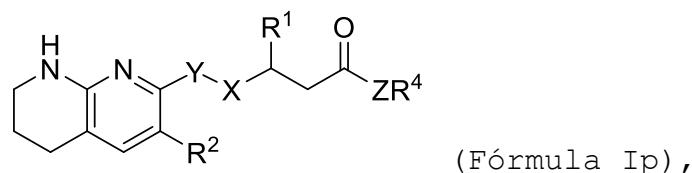
[0034] Em modalidades da Fórmula I, R¹ é um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R¹ compreende uma molécula transportadora. Em algumas modalidades, R¹ é selecionado do



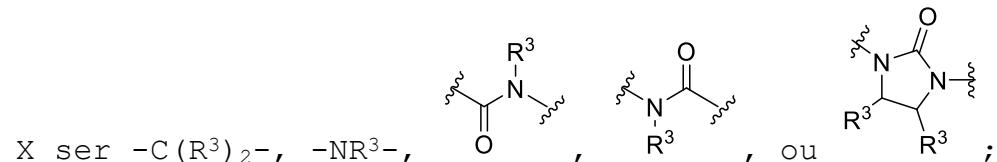
indicar o ponto de fixação e CM compreender uma molécula transportadora.

Precursors do ligante dirigido à integrina

[0035] Em algumas modalidades, a invenção fornece os precursores do ligante dirigido à integrina que podem ser usados para fixar um ligante dirigido à integrina a uma parte compreendendo uma molécula transportadora. Aqui fornecidos estão os precursores do ligante dirigido à integrina da fórmula:



caracterizado por



Y ser um alquíleno substituído facultativamente;

Z ser O, NR³ ou S;

n ser um número inteiro de 1 a 8;

R¹ ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R¹ compreender uma molécula transportadora;

R^2 ser H, um alquil substituído facultativamente ou R^2 compreender uma molécula transportadora;

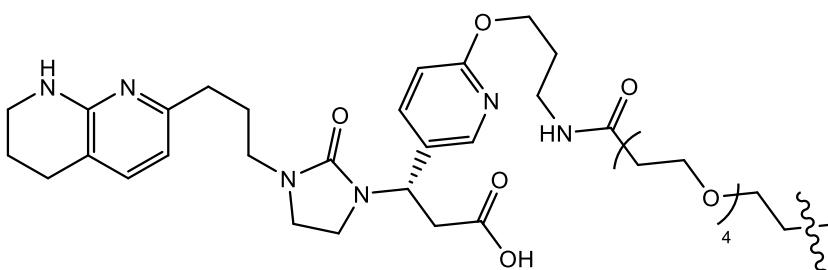
cada instância de R^3 ser selecionada de maneira independente a partir do grupo consistindo em H e um alquil substituído facultativamente ou R^3 compreender uma molécula transportadora;

R^4 ser H ou um alquil substituído facultativamente; e caracterizado por pelo menos um de Y, R^1 , R^2 , qualquer instância de R^3 e R^4 compreender um grupo reativo.

[0036] Em algumas modalidades dos compostos da Fórmula I_p, o grupo reativo compreende uma azida.

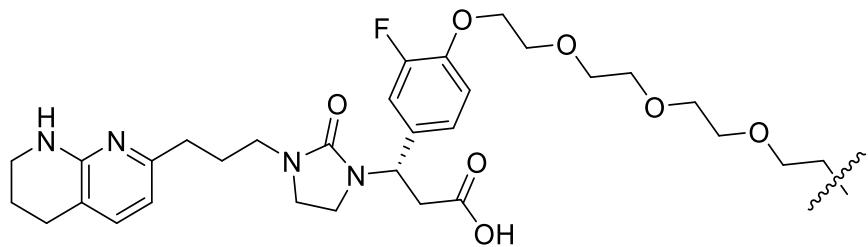
Compostos da Fórmula I

[0037] Em algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui têm estruturas que incluem, consistem ou consistem essencialmente em qualquer uma das estruturas representadas pelo seguinte:

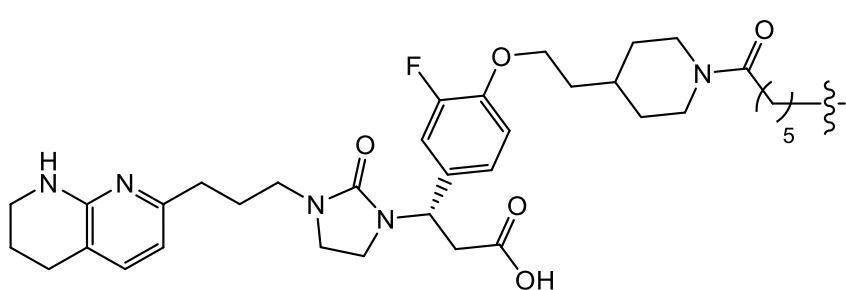
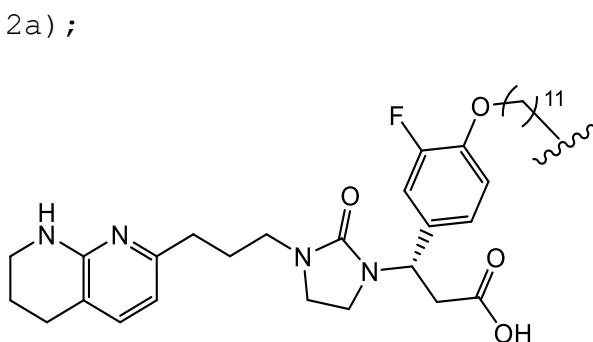


(Estrutura

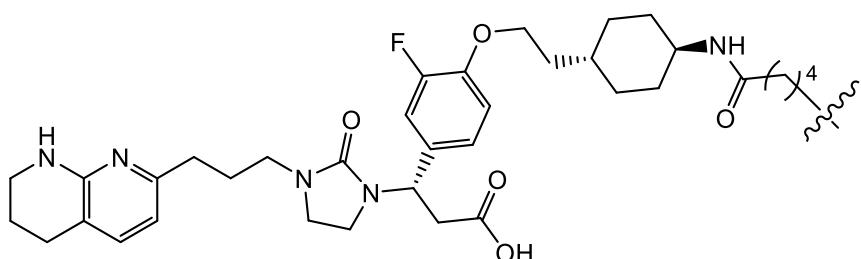
1a);



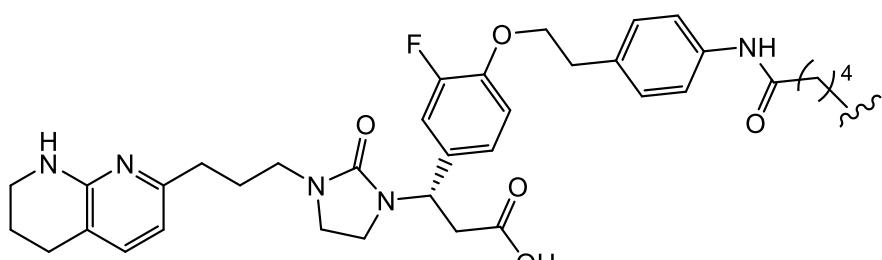
(Estrutura



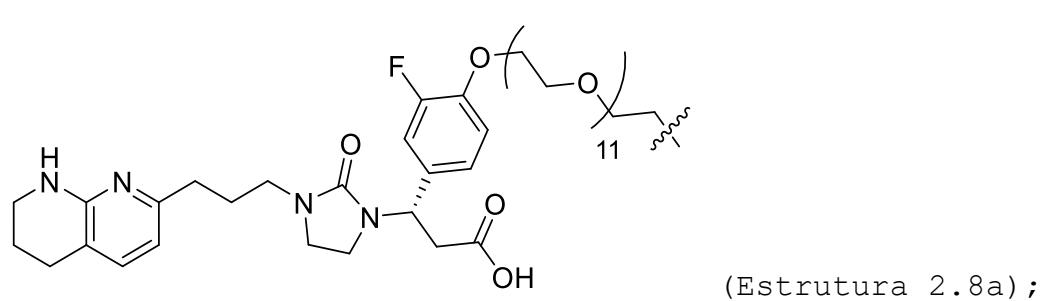
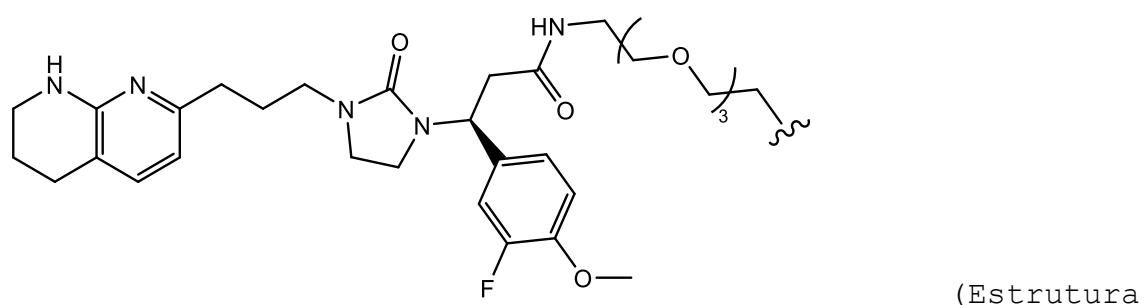
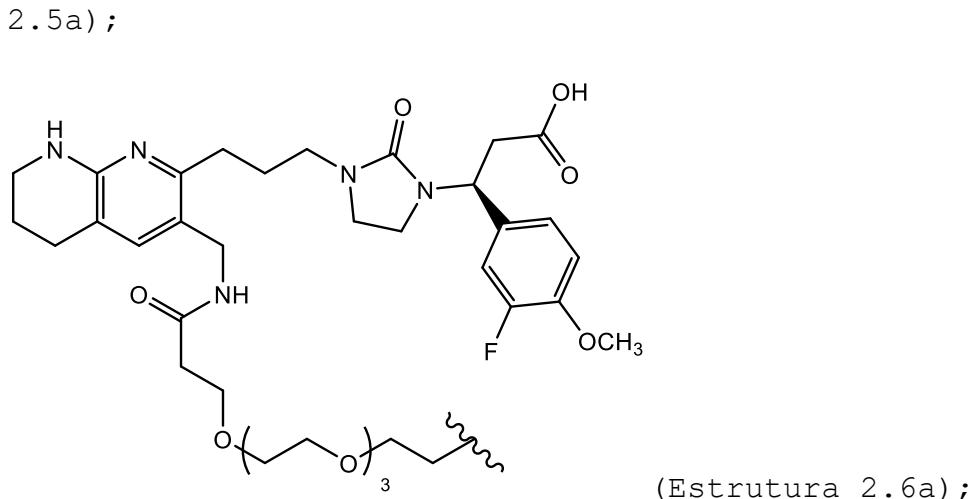
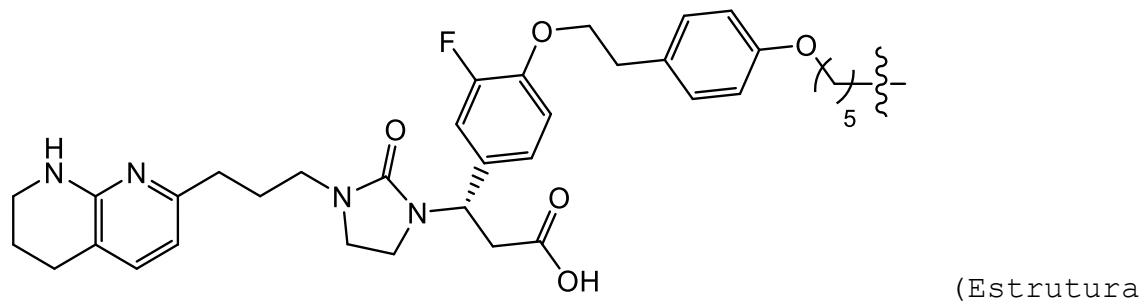
2.2a);

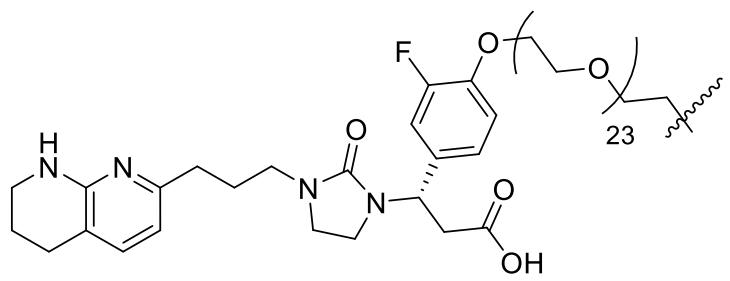


2.3a);

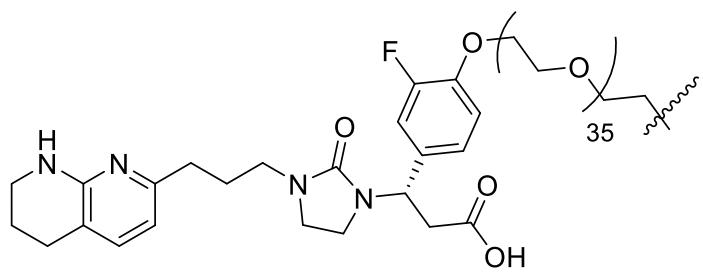


2.4a);

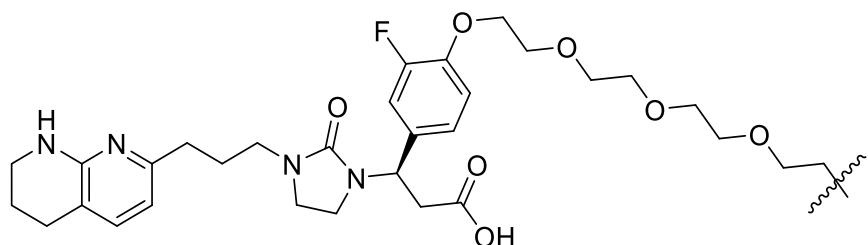




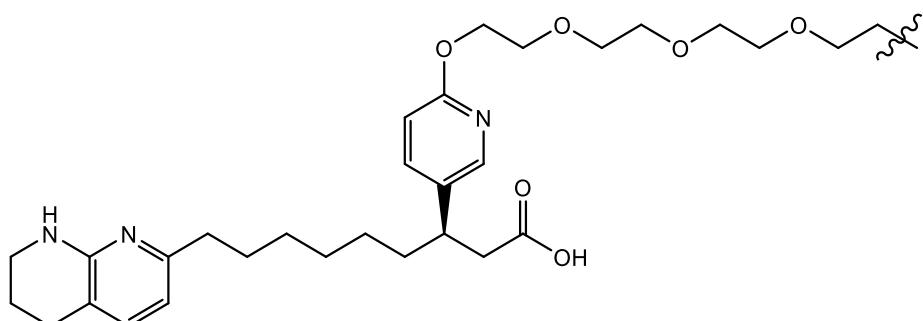
(Estrutura 2.9a);



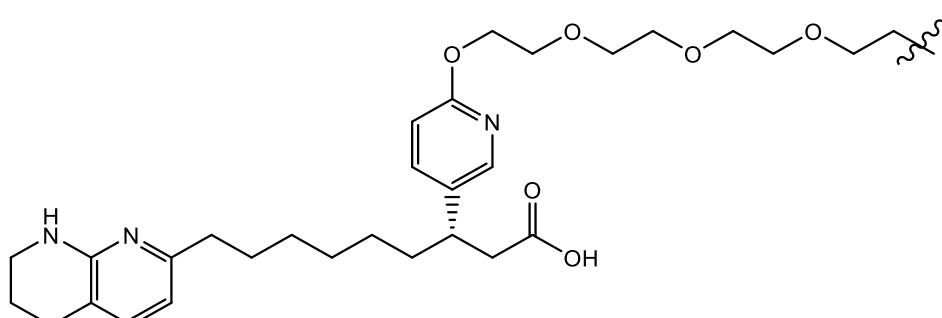
(Estrutura 2.10a);



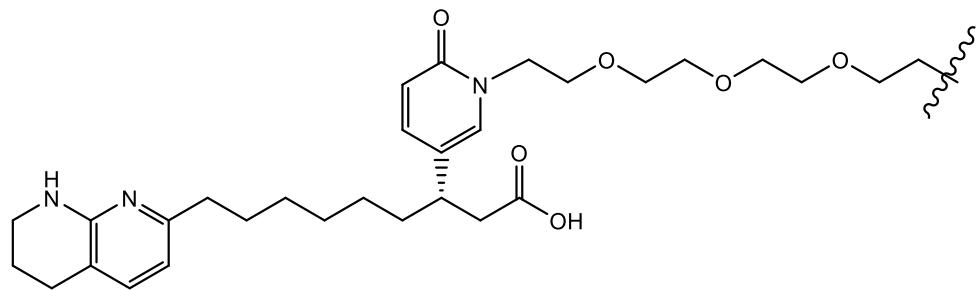
(Estrutura 2.11a);



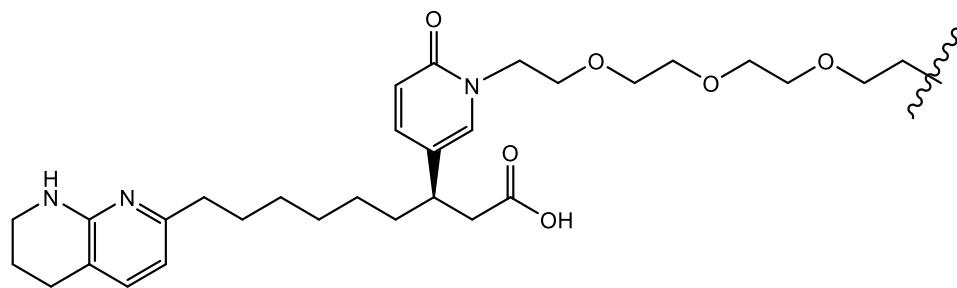
(Estrutura 28a);



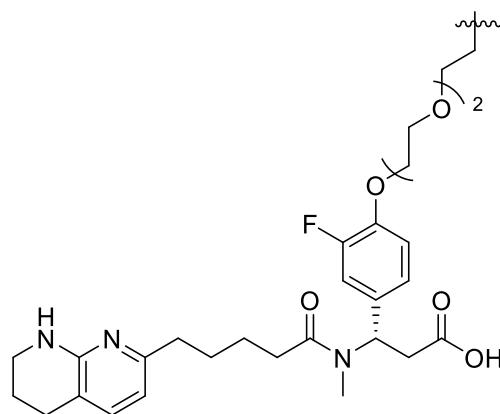
(Estrutura 29a);



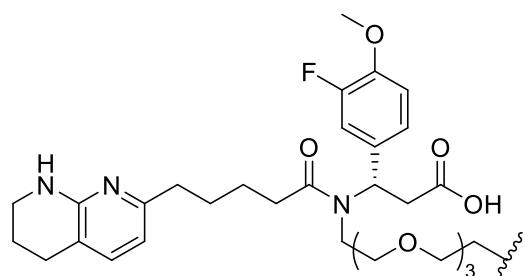
(Estrutura 30a);



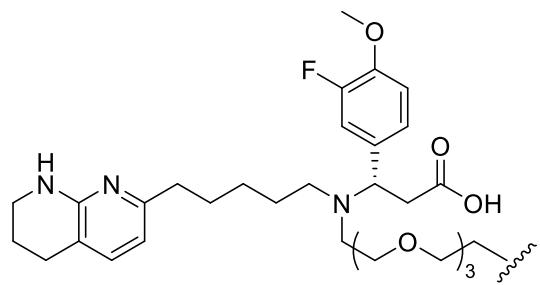
(Estrutura 31a);



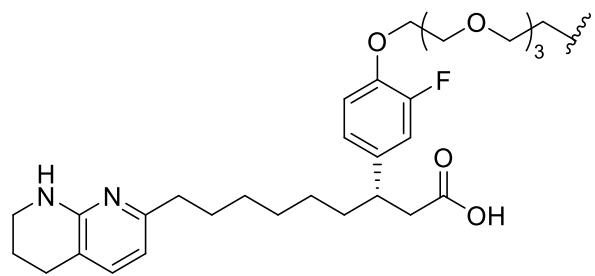
(Estrutura 32a);



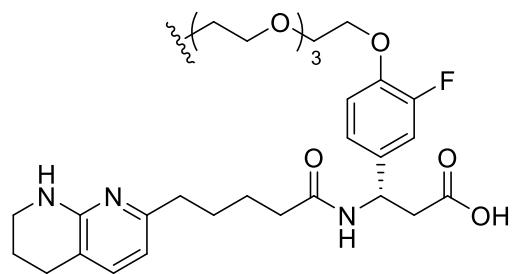
(Estrutura 33a);



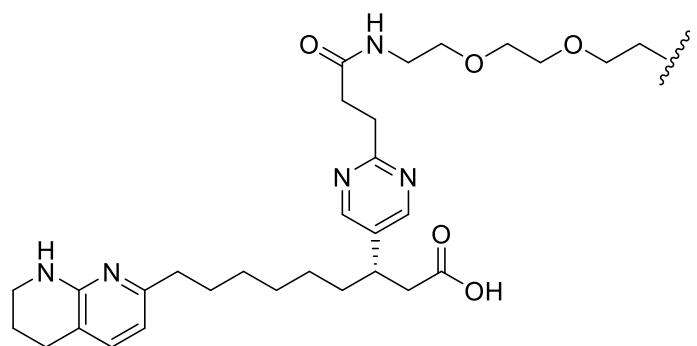
(Estrutura 34a);



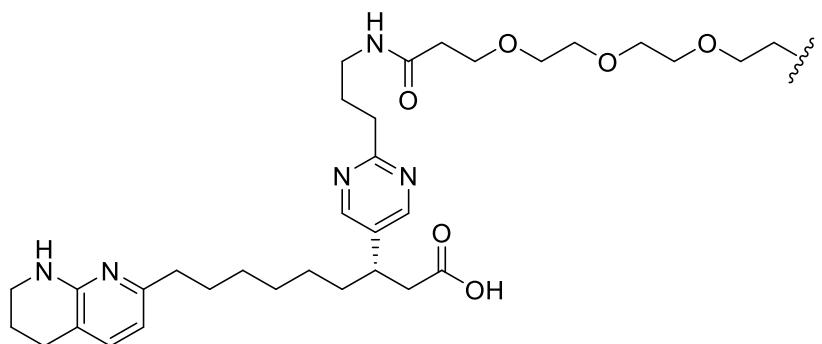
(Estrutura 36a);



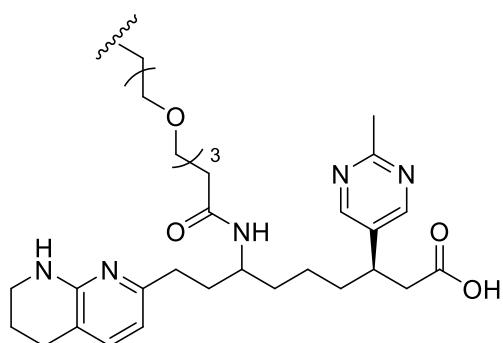
(Estrutura 37a);



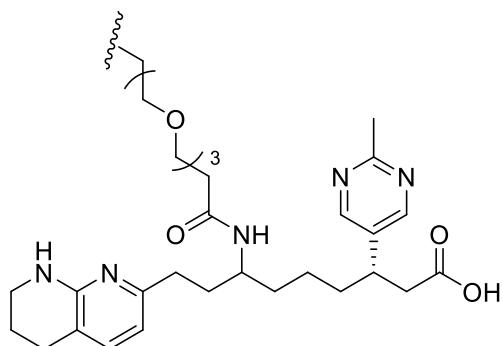
(Estrutura 38a);



(Estrutura 39a);



(Estrutura 40a); e



(Estrutura 41a).

[0038] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui pode ser conjugado com uma ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; ou 1 a 10, 2 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2, 2 a 10, 3 a 10, 4 a 10, 5 a 10, 2 a 5, 2 a 4, ou 3 a 5) moléculas transportadoras (p. ex., qualquer uma das moléculas transportadoras descritas aqui ou conhecidas na técnica).

[0039] Em algumas modalidades, mais de um ligante dirigido à integrina divulgado aqui (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30; ou 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5, 5 a 30, 5 a 25, 5 a 20, 5 a 15, 5 a 10, 10 a 30, 10 a 25, 10 a 20, 10 a 15, 15 a 30, 15 a 25, 15 a 20, 20 a 30, 20 a 25, ou 25 a 30 ligantes dirigidos à integrina) podem ser conjugados com uma molécula transportadora (p. ex., qualquer uma das moléculas transportadoras descritas aqui ou conhecidas na técnica).

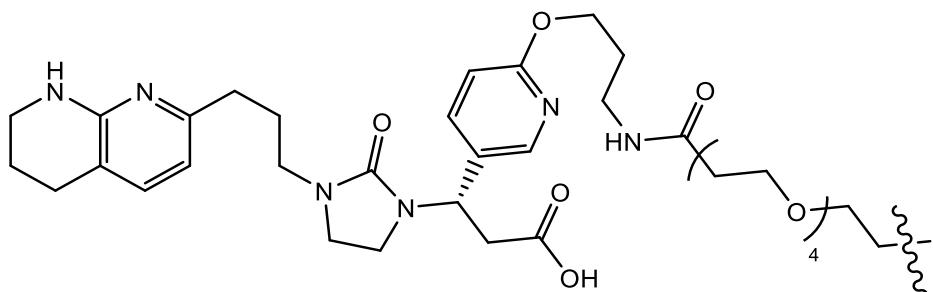
[0040] Em algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui são conjugados facultativamente com uma ou mais moléculas transportadoras por meio de um grupo de ligação, como, por exemplo, um grupo de polietilenoglicol (PEG).

[0041] Em algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui são conjugados facultativamente com uma ou mais moléculas transportadoras por meio de um andaime que inclui pelo menos um ponto de fixação para cada ligante e pelo menos um ponto de fixação para cada molécula transportadora. Em algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina compreendem, consistem em ou consistem essencialmente em um ligante dirigido à integrina conjugado com uma molécula transportadora. Em algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina compreendem, consistem em ou

consistem essencialmente em um ligante dirigido à integrina conjugado com mais de uma molécula transportadora.

Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina compreende, consistem ou consiste essencialmente em qualquer uma das seguintes: Estrutura 1a, Estrutura 2a, Estrutura 2.1a, Estrutura 2.2a, Estrutura 2.3a, Estrutura 2.4a, Estrutura 2.5a, Estrutura 2.6a, Estrutura 2.8a, Estrutura 2.9a, Estrutura 2.10a, Estrutura 2.11a, Estrutura 28a, Estrutura 29a, Estrutura 30a, Estrutura 31a, Estrutura 32a, Estrutura 33a, Estrutura 34a, Estrutura 36a, Estrutura 37a, Estrutura 38a, Estrutura 39a, Estrutura 40a e Estrutura 41a, cada uma conforme divulgado aqui.

[0042] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:

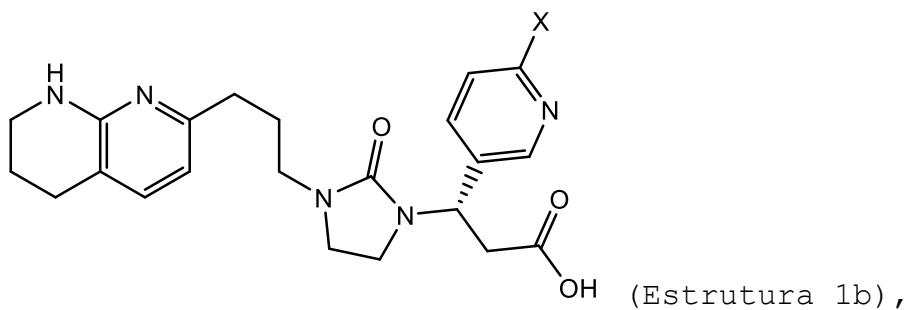


(Estrutura 1a).

[0043] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 1a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

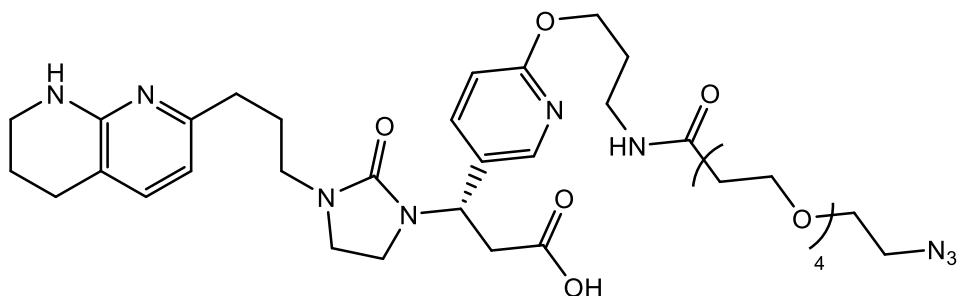
[0044] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo,

um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

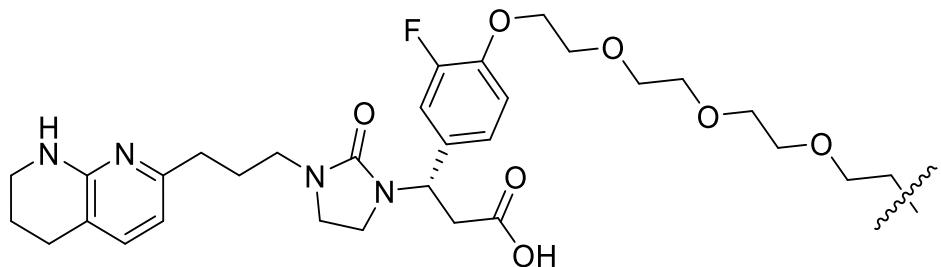
[0045] Em algumas modalidades, um precursor de ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 1c).

[0046] Um grupo reativo (ou grupo reativo protegido) pode ser usado para facilitar a conjugação do ligante dirigido à integrina com uma molécula de interesse, p. ex., a uma molécula transportadora (diretamente ou através de um ou mais andaimes e/ou ligantes).

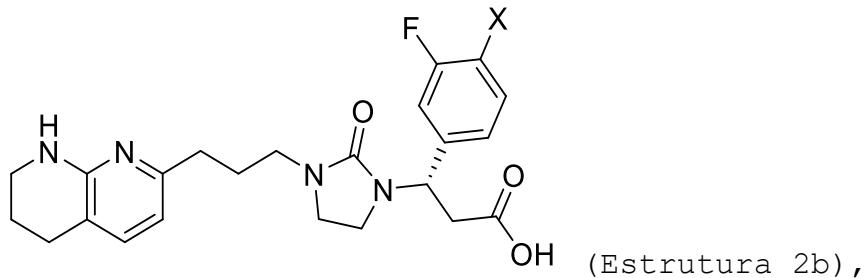
[0047] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 2a).

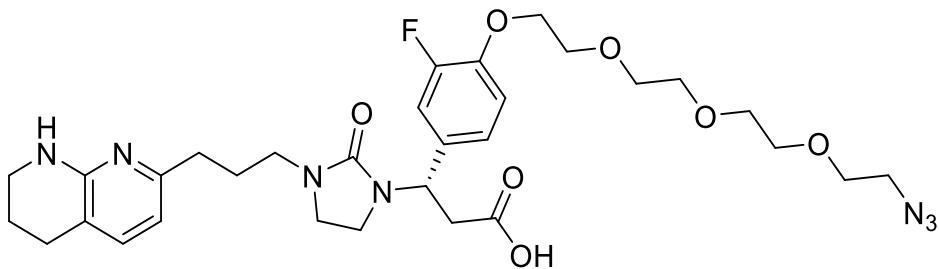
[0048] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 2a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

[0049] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



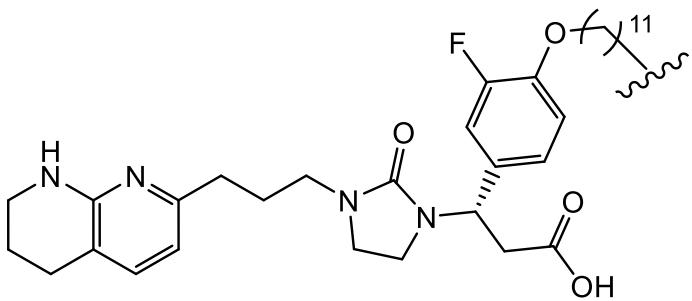
em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0050] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 2c).

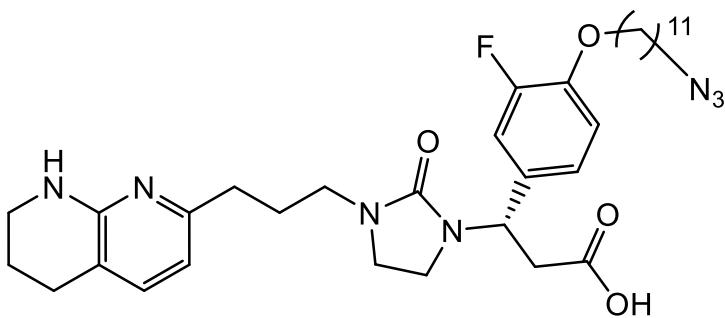
[0051] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 2.1a).

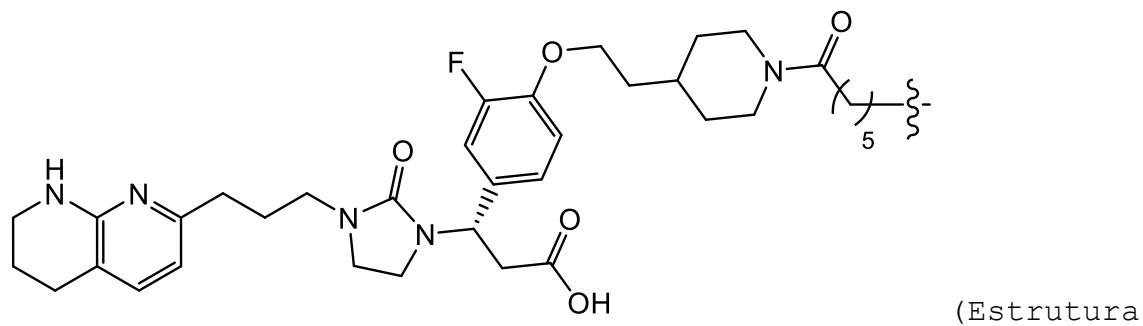
[0052] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 2.1a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

[0053] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



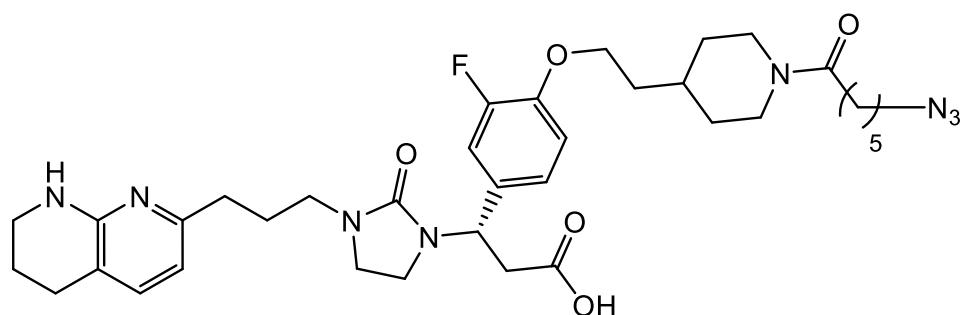
(Estrutura 2.1c).

[0054] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



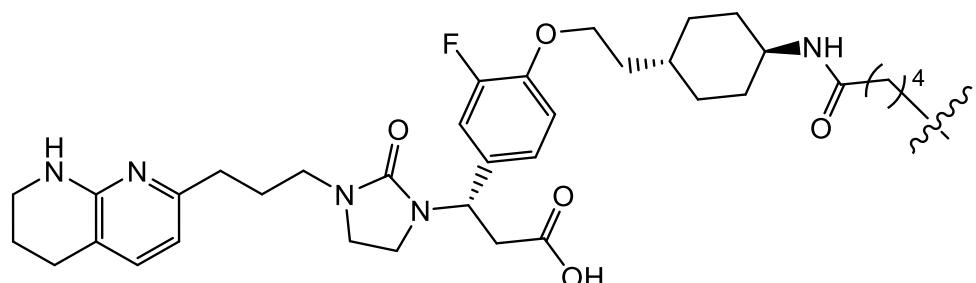
[0055] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,2a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

[0056] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 2.2c).

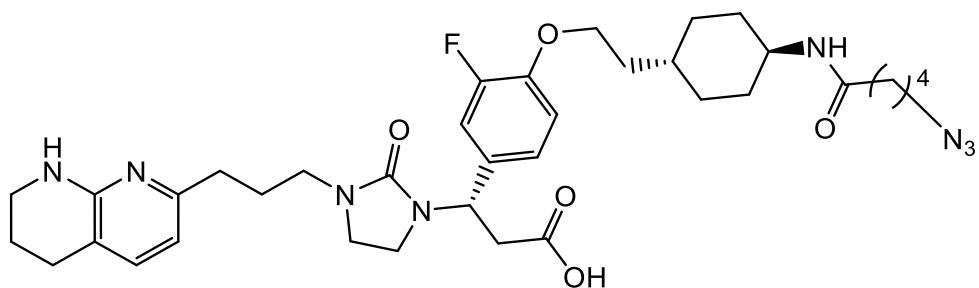
[0057] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 2,3a).

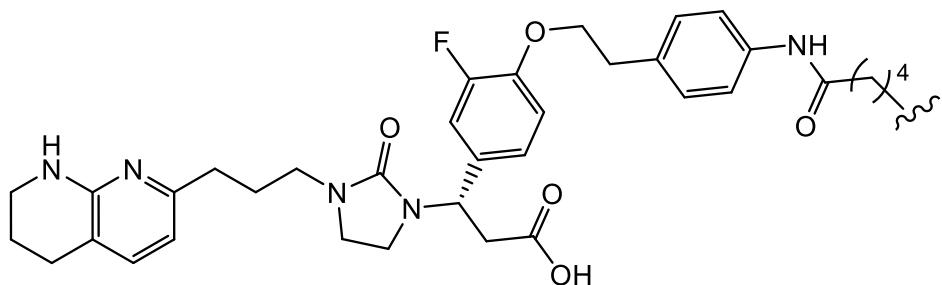
[0058] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,3a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

[0059] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 2,3c).

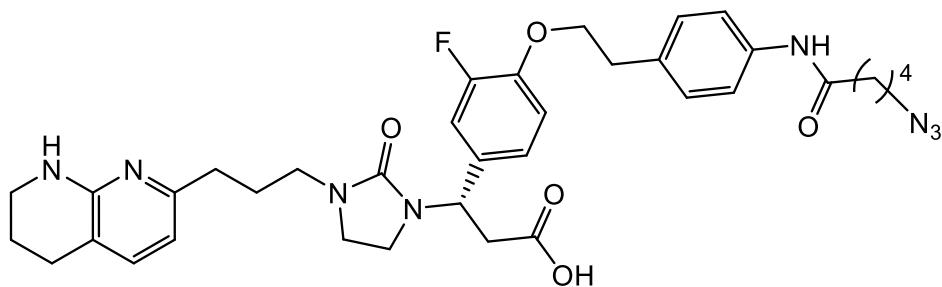
[0060] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 2,4a).

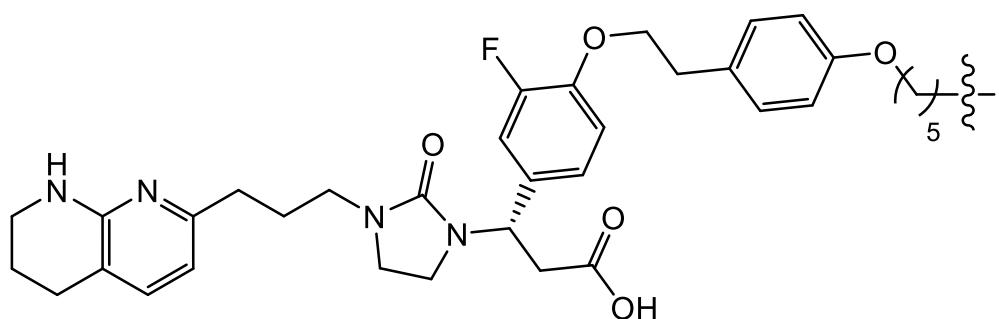
[0061] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,4a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

[0062] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 2.4c).

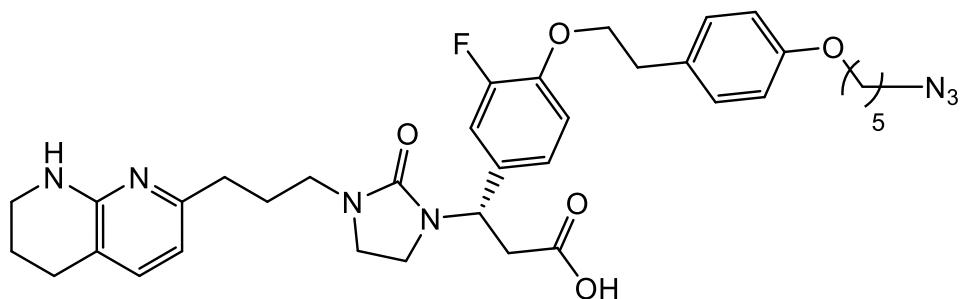
[0063] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 2.5a).

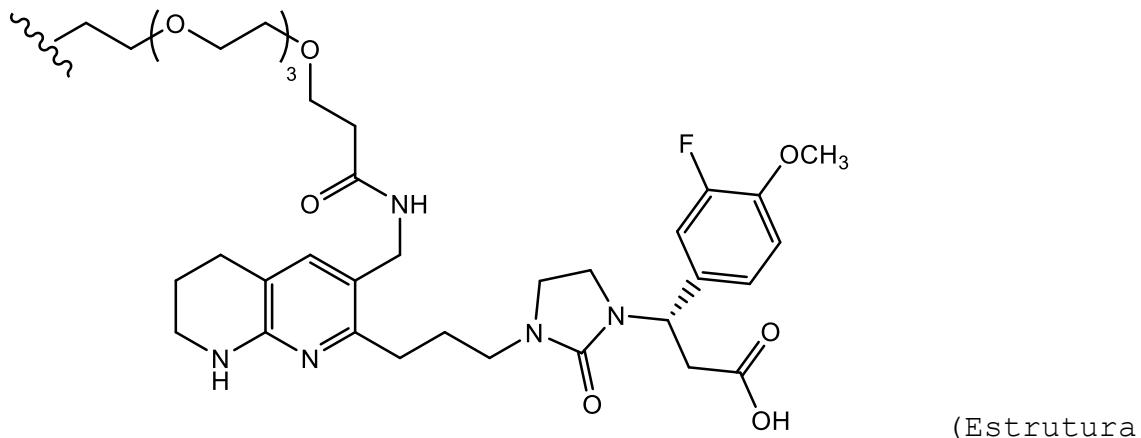
[0064] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 2.5a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

[0065] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 2.5c).

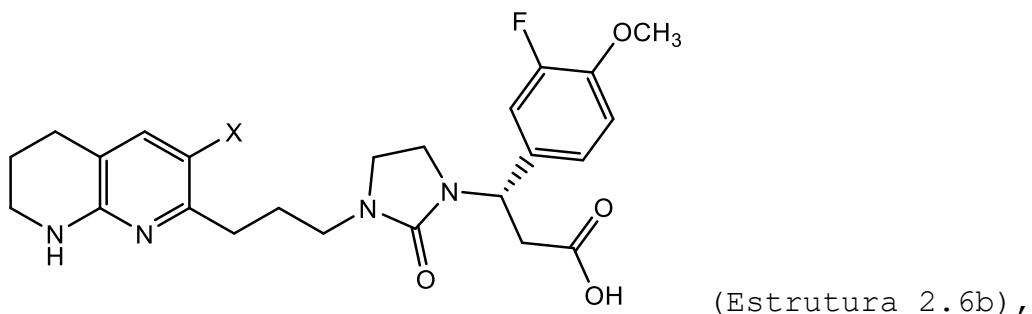
[0066] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



2,6a).

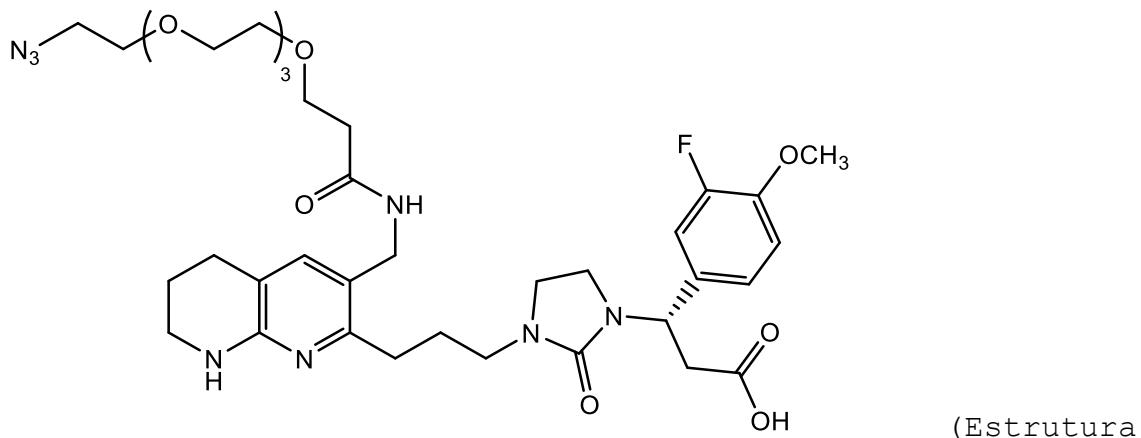
[0067] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,6a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

[0068] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

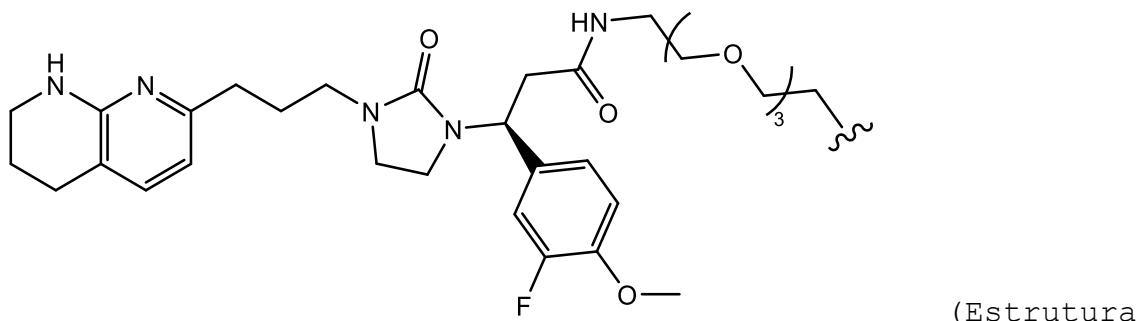
[0069] Em algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina podem ser sintetizados para incluir um grupo reativo de azida e compreendem a seguinte estrutura:



2.6c).

[0070] Um grupo reativo (ou grupo reativo protegido) pode ser usado para facilitar a conjugação do ligante dirigido à integrina com uma molécula de interesse, p. ex., a uma molécula transportadora (diretamente ou através de um ou mais andaimes e/ou ligantes).

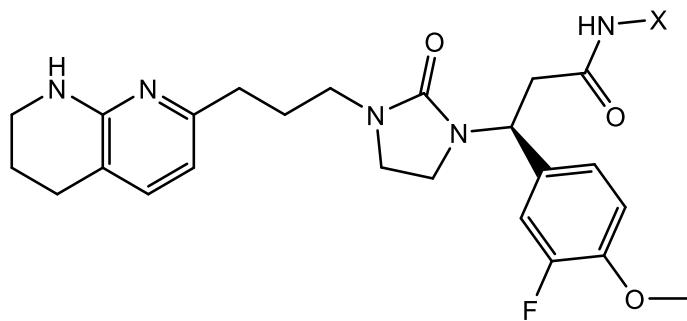
[0071] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



2,7a).

[0072] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,7a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

[0073] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:

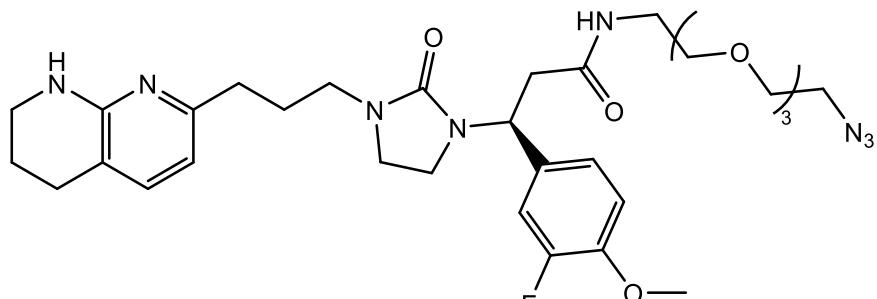


(Estrutura

2.7b),

em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0074] Em algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina podem ser sintetizados para incluir um grupo reativo de azida e compreendem a seguinte estrutura:

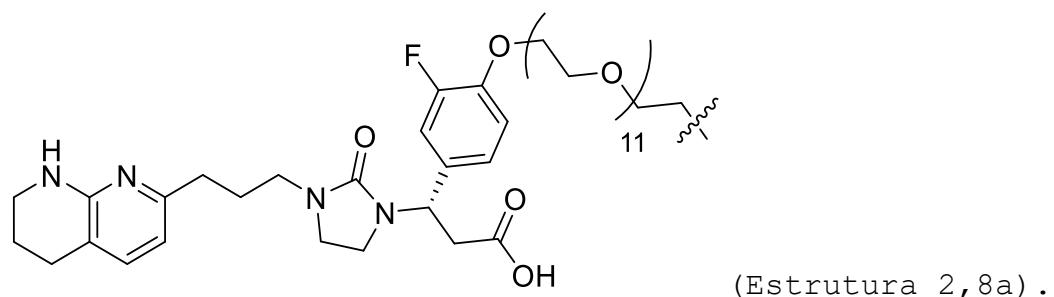


(Estrutura

2.7c).

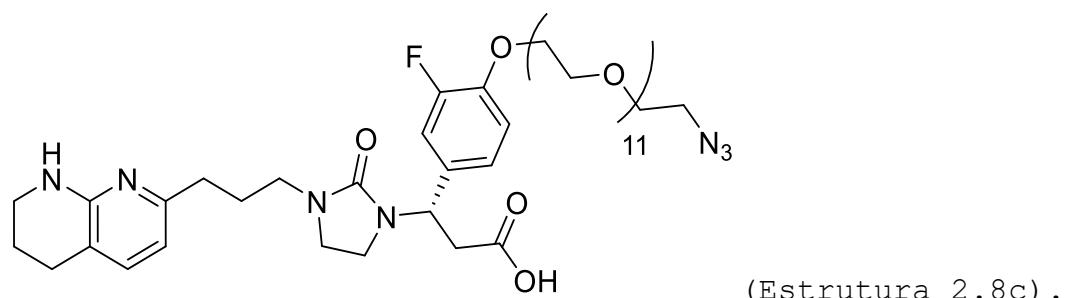
[0075] Um grupo reativo (ou grupo reativo protegido) pode ser usado para facilitar a conjugação do ligante dirigido à integrina com uma molécula de interesse, p. ex., a uma molécula transportadora (diretamente ou através de um ou mais andaimes e/ou ligantes).

[0076] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



[0077] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,8a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

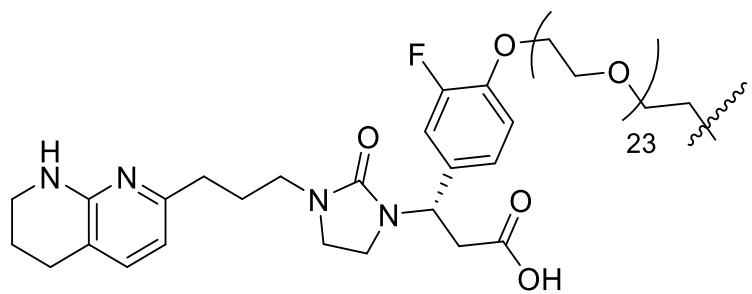
[0078] Em algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina podem ser sintetizados para incluir um grupo reativo de azida e compreendem a seguinte estrutura:



[0079] Um grupo reativo (ou grupo reativo protegido) pode ser usado para facilitar a conjugação do ligante dirigido à integrina com uma molécula de interesse, p. ex., a uma

molécula transportadora (diretamente ou através de um ou mais andaimes e/ou ligantes).

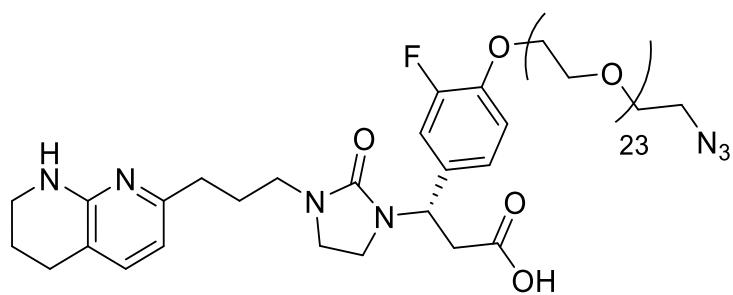
[0080] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 2,9a).

[0081] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,9a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

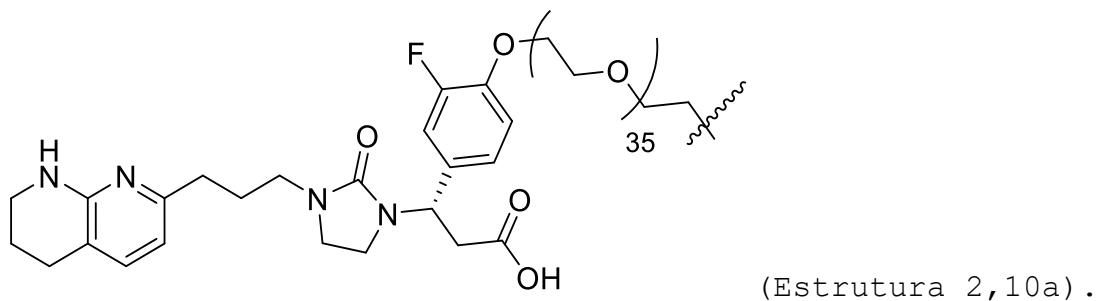
[0082] Em algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina podem ser sintetizados para incluir um grupo reativo de azida e compreendem a seguinte estrutura:



(Estrutura 2,9c).

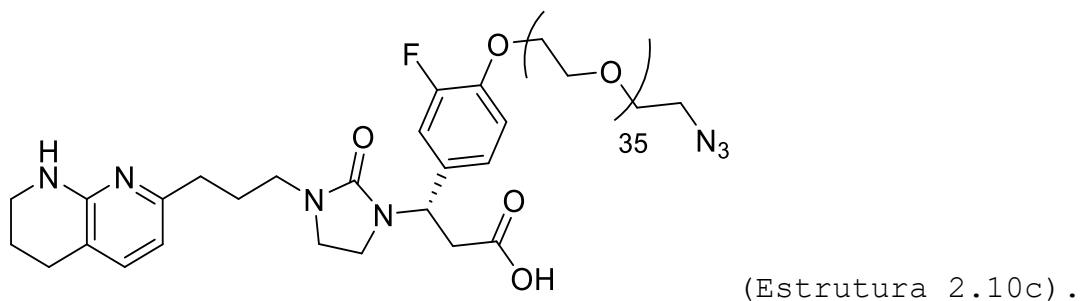
[0083] Um grupo reativo (ou grupo reativo protegido) pode ser usado para facilitar a conjugação do ligante dirigido à integrina com uma molécula de interesse, p. ex., a uma molécula transportadora (diretamente ou através de um ou mais andaimes e/ou ligantes).

[0084] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



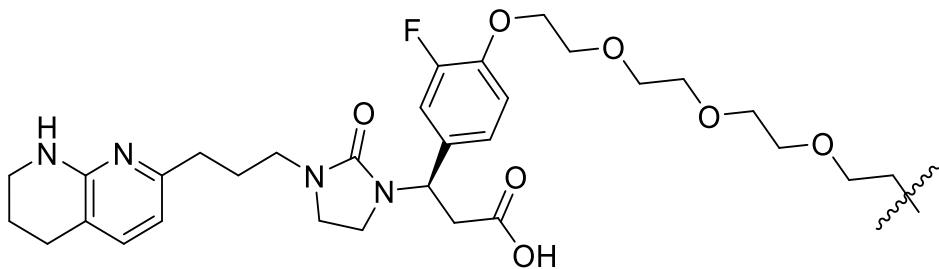
[0085] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,10a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

[0086] Em algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina podem ser sintetizados para incluir um grupo reativo de azida e compreendem a seguinte estrutura:



[0087] Um grupo reativo (ou grupo reativo protegido) pode ser usado para facilitar a conjugação do ligante dirigido à integrina com uma molécula de interesse, p. ex., a uma molécula transportadora (diretamente ou através de um ou mais andaimes e/ou ligantes).

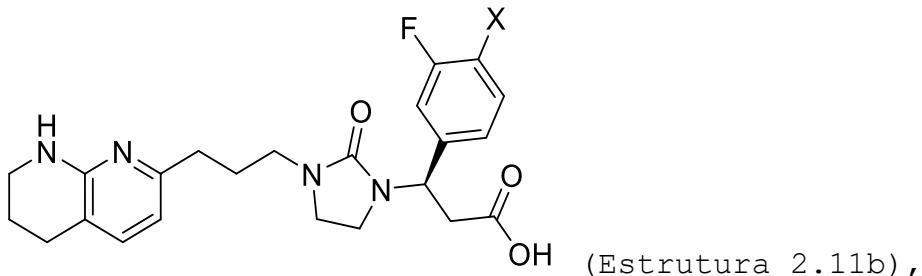
[0088] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 2,11a).

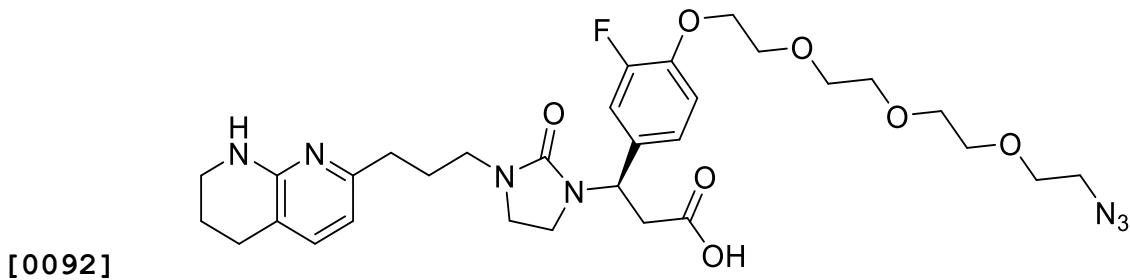
[0089] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,11a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

[0090] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

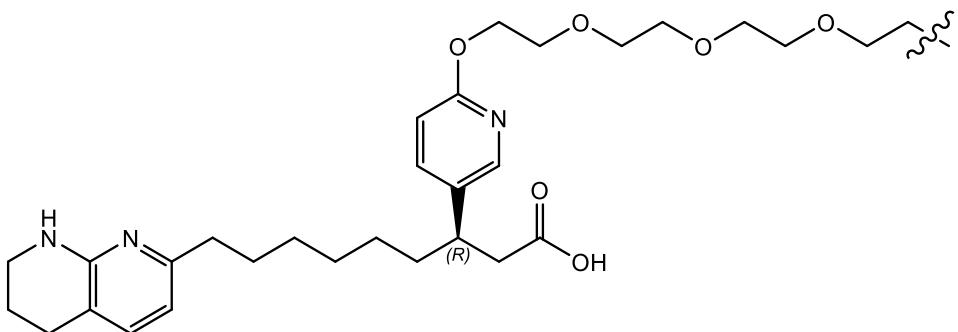
[0091] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 2.11c).

[0093] Um grupo reativo (ou grupo reativo protegido) pode ser usado para facilitar a conjugação do ligante dirigido à integrina com uma molécula de interesse, p. ex., a uma molécula transportadora (diretamente ou através de um ou mais andaimes e/ou ligantes).

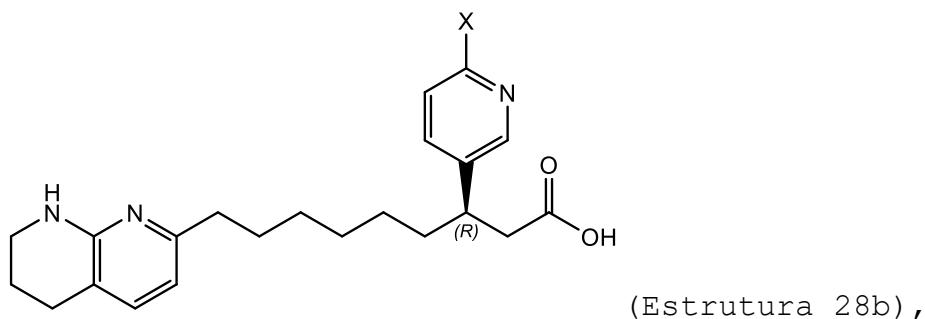
[0094] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 28a).

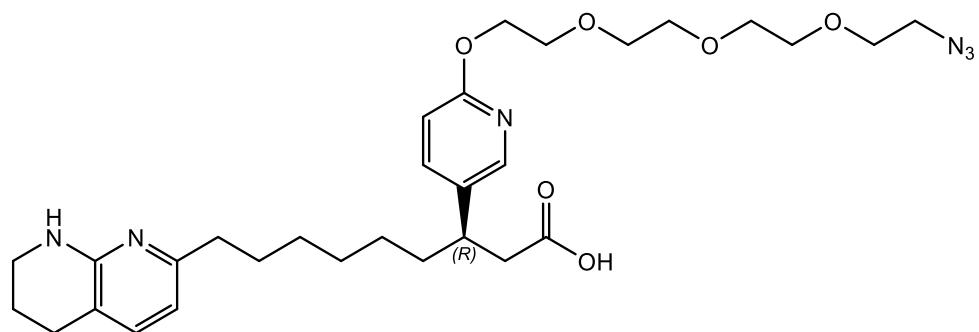
[0095] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 28a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

[0096] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



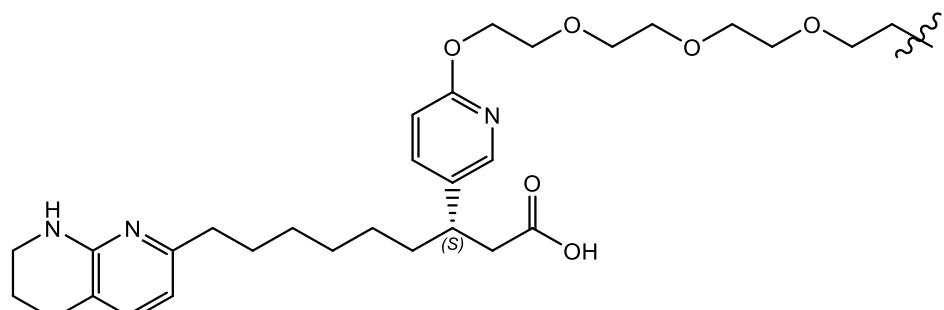
em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0097] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 28c).

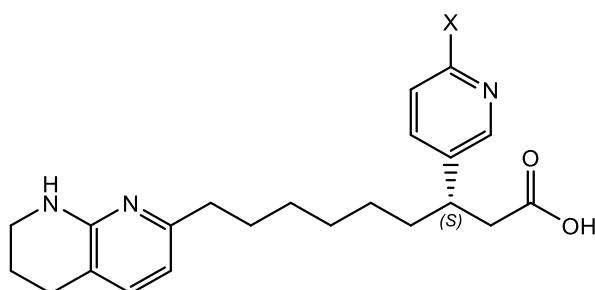
[0098] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 29a).

[0099] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 29a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

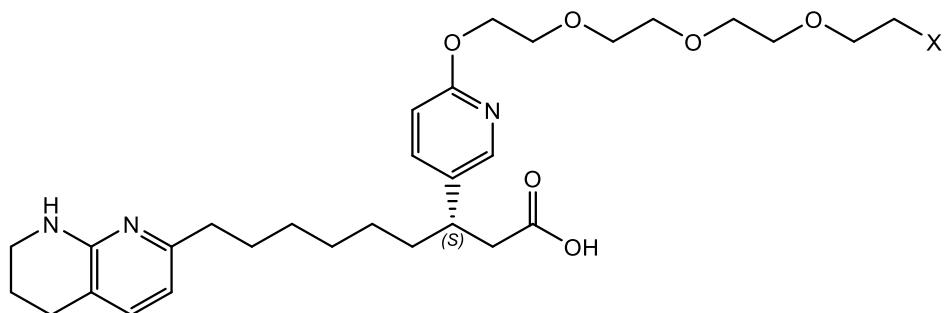
[0100] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 29b),

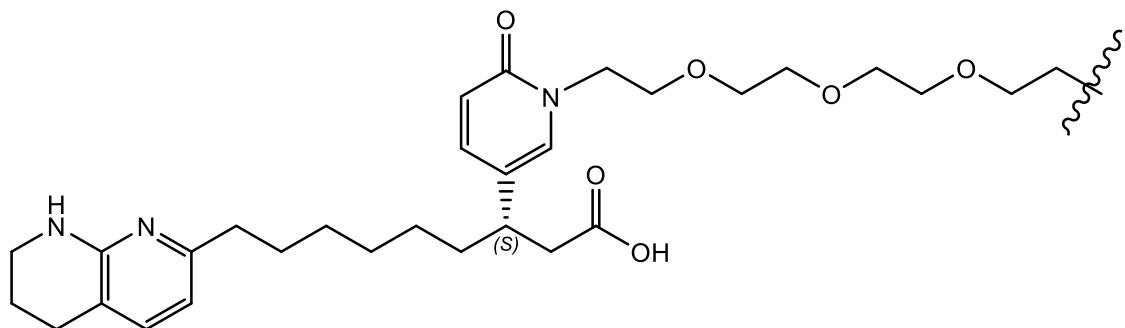
em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0101] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 29c).

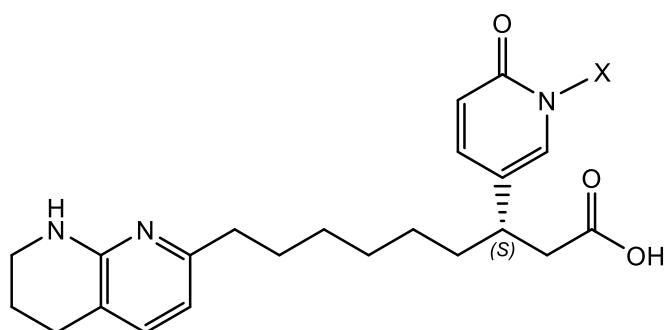
[0102] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 30a).

[0103] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 30a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

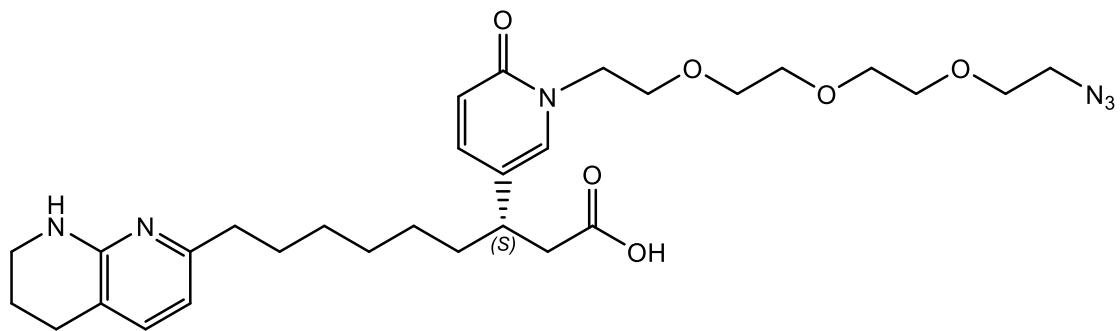
[0104] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 30b),

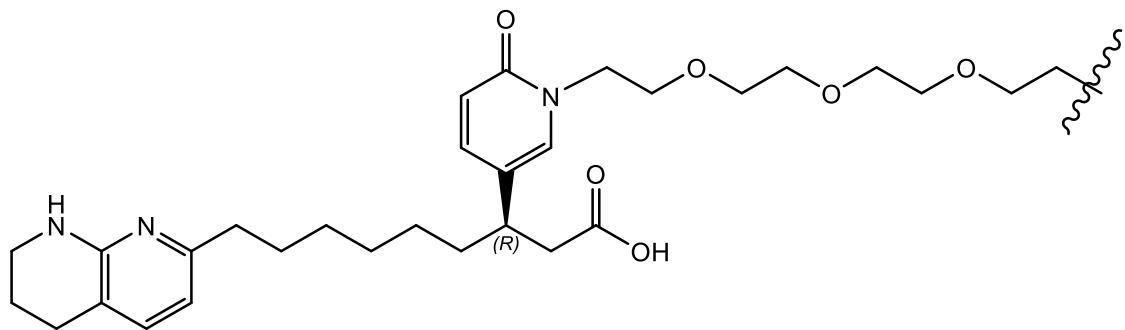
em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0105] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 30c).

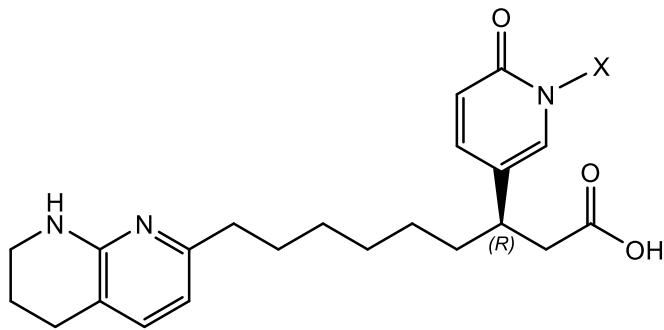
[0106] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 31a).

[0107] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 31a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

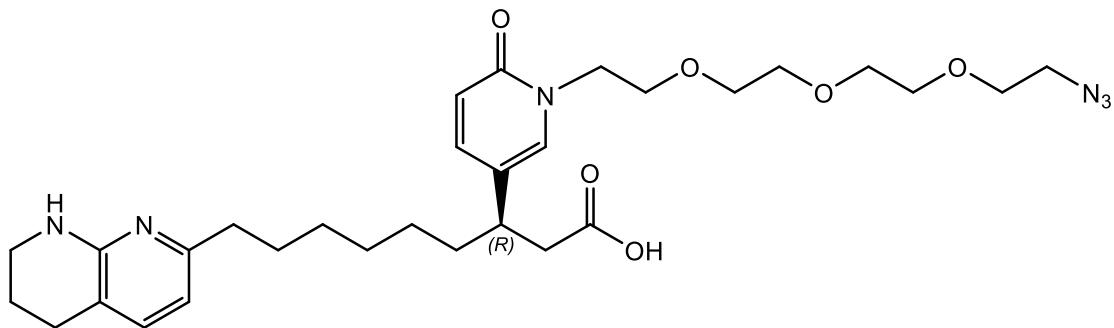
[0108] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 31b),

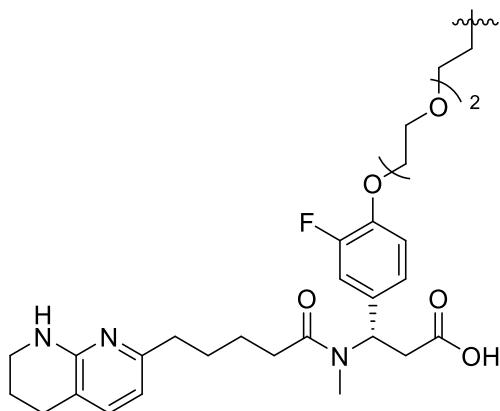
em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0109] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 31c).

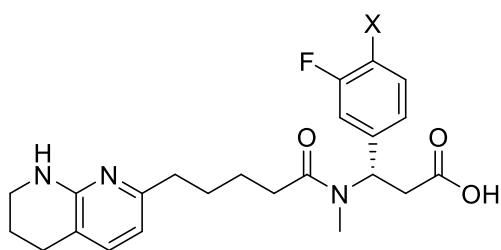
[0110] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 32a).

[0111] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 32a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

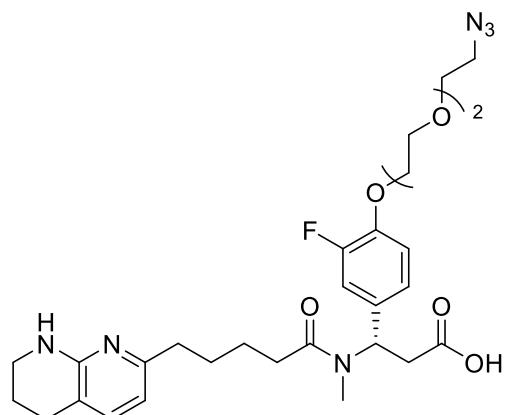
[0112] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 32b),

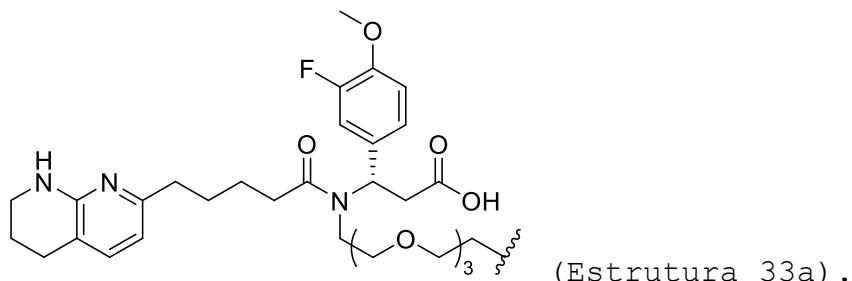
em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0113] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



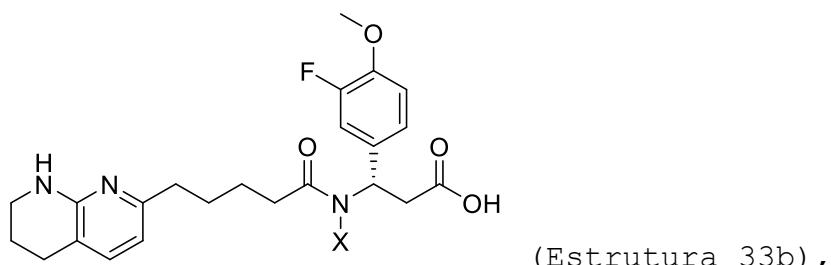
(Estrutura 32c).

[0114] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



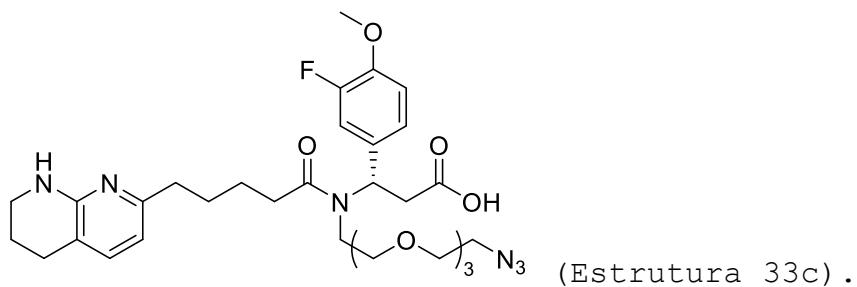
[0115] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 33a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

[0116] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:

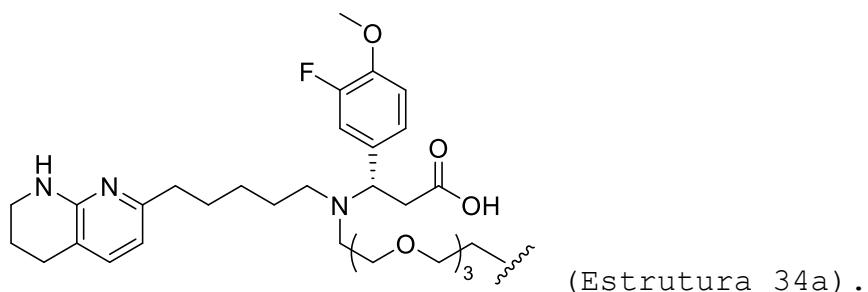


em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0117] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:

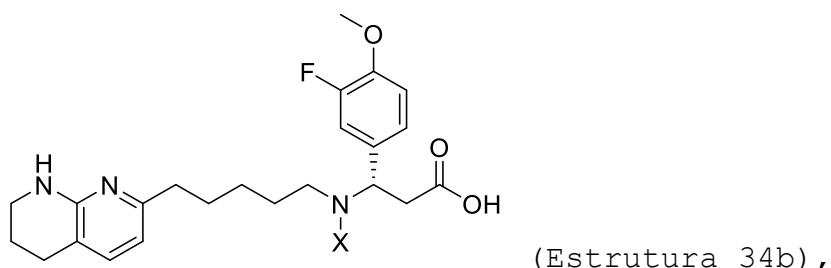


[0118] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



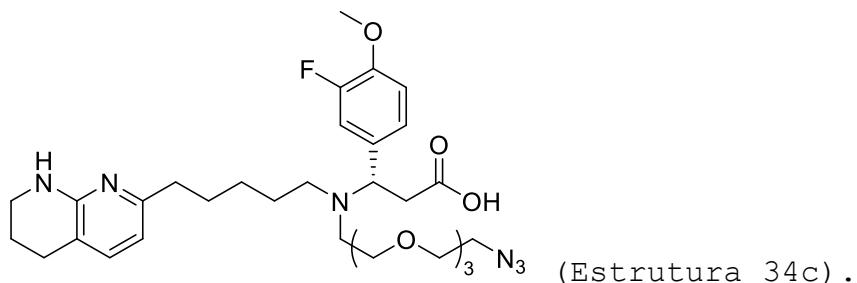
[0119] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 34a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

[0120] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:

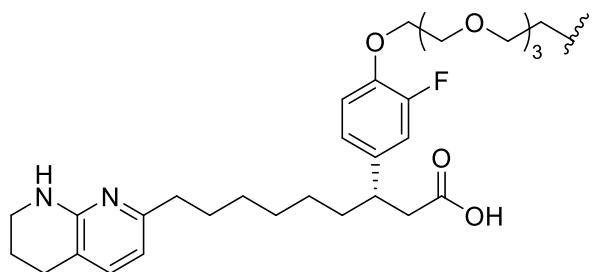


em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0121] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



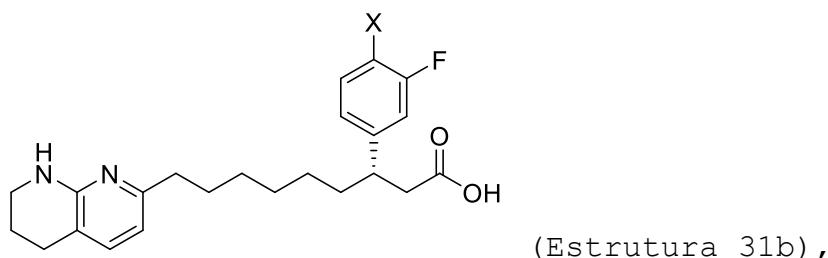
[0122] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 36a).

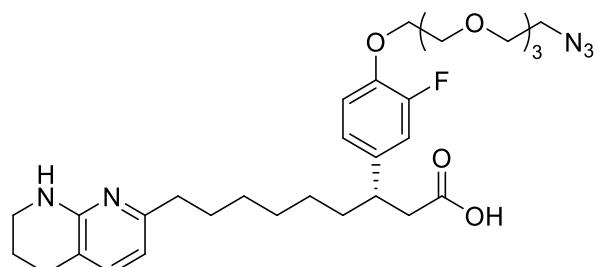
[0123] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 36a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

[0124] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



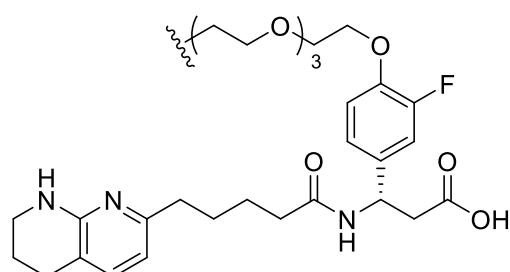
em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0125] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 31c).

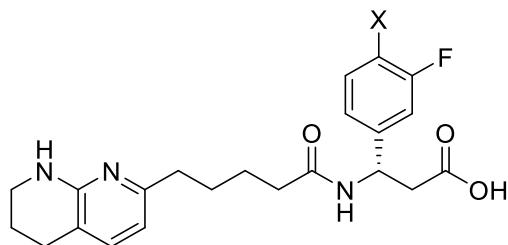
[0126] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 37a).

[0127] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 37a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

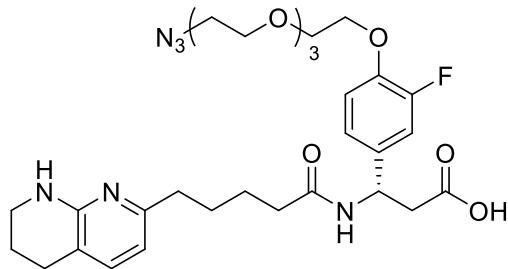
[0128] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 37b),

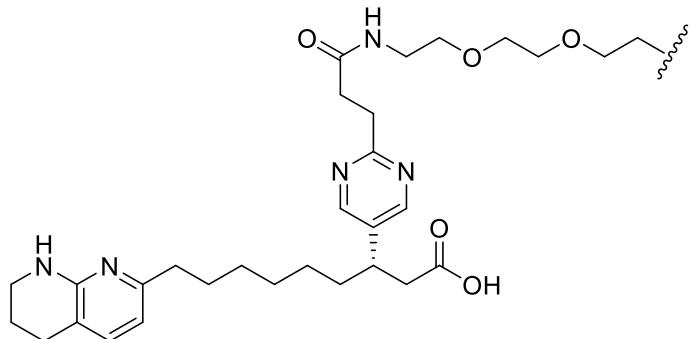
em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0129] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 37c).

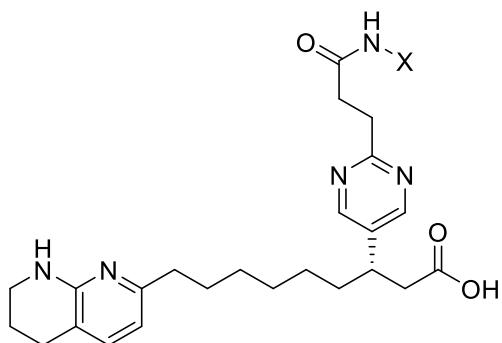
[0130] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 38a).

[0131] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 38a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

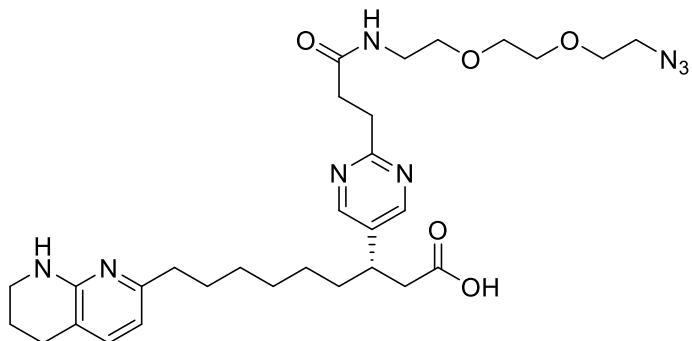
[0132] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 38b),

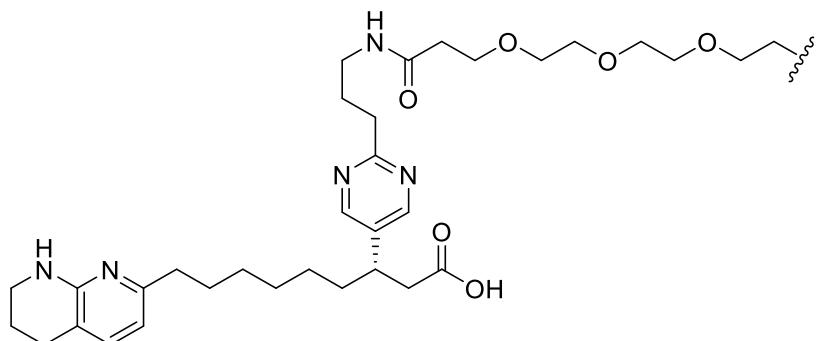
em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0133] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 38c).

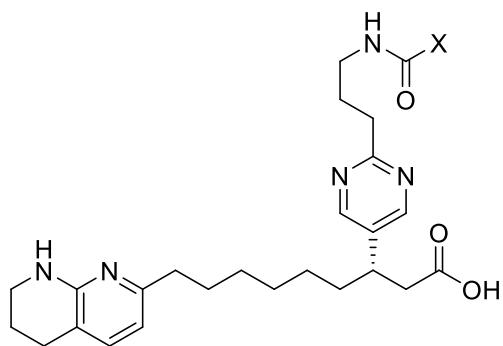
[0134] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 39a).

[0135] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 39a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

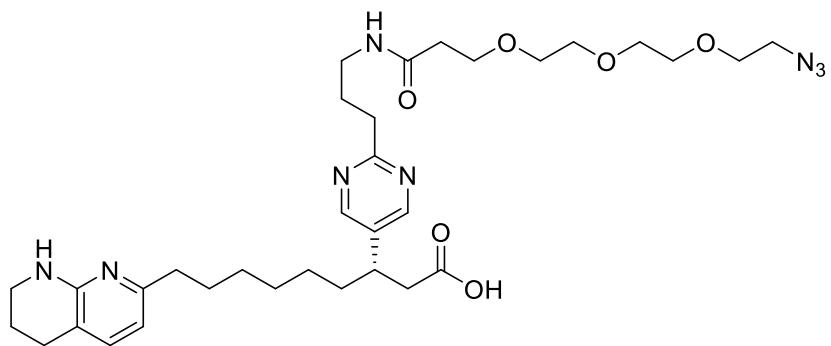
[0136] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 39b),

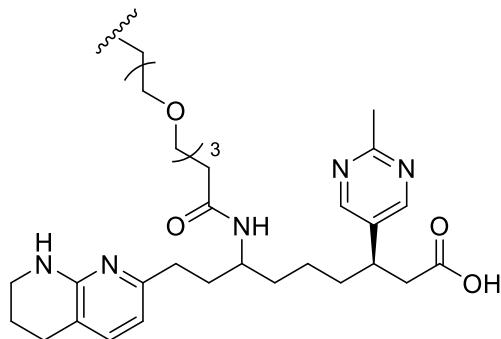
em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0137] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 39c).

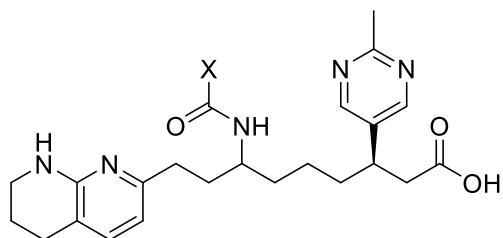
[0138] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 40a).

[0139] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 40a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

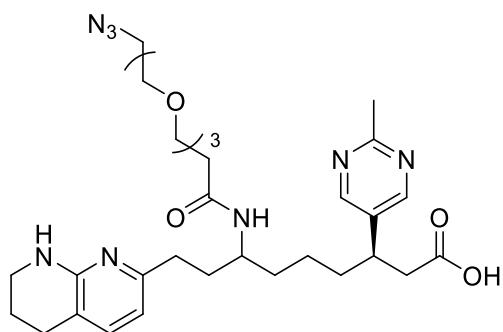
[0140] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 40b),

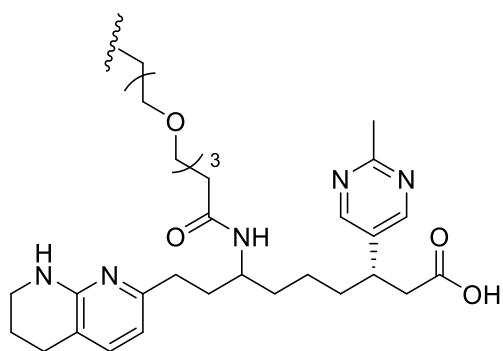
em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0141] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 40c).

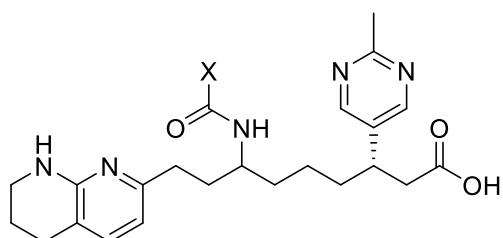
[0142] Em algumas modalidades, um ligante dirigido à integrina divulgado aqui compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 41a).

[0143] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina da Estrutura 41a está ligado a uma ou mais moléculas transportadoras (p. ex., agente(s) de RNAi).

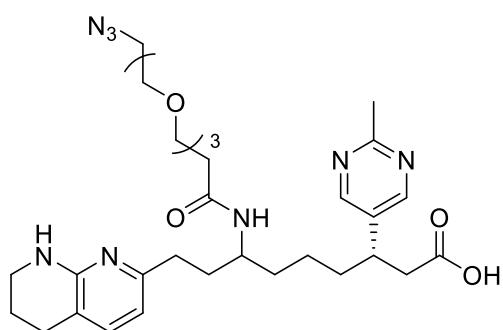
[0144] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 41b),

em que X inclui um grupo reativo, um grupo reativo protegido ou uma molécula transportadora (p. ex., um agente de RNAi).

[0145] Em algumas modalidades, o ligante dirigido à integrina pode ser sintetizado para incluir um grupo reativo de azida e compreende a seguinte estrutura:



(Estrutura 41c).

[0146] O grupo reativo de azida conforme divulgado em qualquer uma das Estrutura 1c, Estrutura 2c, Estrutura 2.1c,

Estrutura 2.2c, Estrutura 2.3c, Estrutura 2.4c, Estrutura 2.5c, Estrutura 2.6c, Estrutura 2.7c, Estrutura 2.8c, Estrutura 2.9c , Estrutura 2.10c, Estrutura 2.11c, Estrutura 28c, Estrutura 29c, Estrutura 30c, Estrutura 31c, Estrutura 32c, Estrutura 33c, Estrutura 34c, Estrutura 36c, Estrutura 37c, Estrutura 38c, Estrutura 39c, Estrutura 40c e Estrutura 41c pode ser usada para fixar o ligante de integrina a uma molécula de interesse, ou seja, a uma molécula transportadora, como um agente de RNAi. A molécula transportadora pode ser qualquer molécula que se queira ser dirigida a uma célula que expressa integrina.

[0147] Conforme usado neste documento, o termo "alquil" se refere a um grupo de hidrocarboneto alifático saturado, de cadeia linear ou ramificada, tendo de 1 a 10 átomos de carbono, a menos que especificado em contrário. Por exemplo, "alquil C₁-C₆" inclui grupos de alquil tendo 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 carbonos em um arranjo linear ou ramificado. Exemplos não limitativos de grupos alquil incluem metil, etil, isopropil, terc-butil, *n*-hexil. Tal como aqui utilizado, o termo "aminoalquil" refere-se a um grupo alquil conforme definido acima, substituído em qualquer posição por um ou mais grupos amino conforme permitido pela valência normal. Os grupos amino podem ser não substituídos, monossubstituídos ou dissustituidos. Exemplos não limitativos de grupos aminoalquil incluem aminometil, dimetilaminometil e 2-aminoprop-1-il.

[0148] Conforme usado neste documento, o termo "cicloalquil" significa um grupo de anel de hidrocarboneto não aromático saturado ou insaturado, tendo de 3 a 14 átomos de carbono, a menos que especificado em contrário. Exemplos não limitativos de grupos cicloalquil incluem, mas não estão limitados a isso, ciclopropil, metil-ciclopropil, 2,2-dimetil-ciclobutil, 2-etil-ciclopentil e ciclo-hexil. Os cicloalquils podem incluir múltiplos anéis espiro- ou fundidos. Os grupos de cicloalquil são mono-, di-, tri-, tetra- ou penta-substituídos facultativamente em qualquer posição conforme permitido pela valência normal.

[0149] Conforme usado neste documento, o termo "alquenil" se refere a um radical de hidrocarboneto não aromático, linear ou ramificado, contendo pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono e tendo de 2 a 10 átomos de carbono, a menos que especificado em contrário. Até cinco ligações duplas carbono-carbono podem estar presentes nestes grupos. Por exemplo, "C₂-C₆ alquenil" é definido como um radical alquenil que tem de 2 a 6 átomos de carbono. Exemplos de grupos alquenil incluem, mas não estão limitados a isso, etenil, propenil, butenil e ciclohexenil. A porção linear, ramificada ou cíclica do grupo alquenil pode conter ligações duplas e é mono-, di-, tri-, tetra- ou penta-substituída facultativamente em qualquer posição conforme permitido pela valência normal. O termo "cicloalquenil" significa um grupo de hidrocarboneto monocíclico com o número especificado de

átomos de carbono e pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono.

[0150] Conforme usado aqui, o termo "alquinil" se refere a um radical de hidrocarboneto, linear ou ramificado, contendo de 2 a 10 átomos de carbono, a menos que especificado em contrário, e contendo pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono. Até 5 ligações triplas carbono-carbono podem estar presentes. Desta forma, " C_2-C_6 alquinil" significa um radical alquinil que tem de 2 a 6 átomos de carbono. Exemplos de grupos alquinil incluem, mas não estão limitados a isso, etinil, 2-propinil e 2-butinil. A porção linear ou ramificada do grupo alquinil pode ser mono-, di-, tri-, tetra- ou penta-substituída facultativamente em qualquer posição conforme permitido pela valência normal.

[0151] Como utilizado aqui, "alcoxil" ou "alcoxi" refere-se ao radical -O-alquil tendo o número indicado de átomos de carbono. Por exemplo, C_{1-6} alcoxi se destina a incluir grupos C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 e C_6 alcoxi. Por exemplo, C_{1-8} alcoxi se destina a incluir grupos C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 e C_8 alcoxi. Exemplos de alcoxi incluem, mas não estão limitados a, metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, s-butoxi, t-butoxi, n-pentoxi, s-pentoxi, n-heptoxi e n-octoxi.

[0152] Como utilizado aqui, "ceto" refere-se a qualquer grupo alquil, alquenil, alquinil, cicloalquil, cicloalquenil, heterociclico, heteroaril ou aril como aqui definido ligado por meio de uma ponte de carbonil. Exemplos

de grupos ceto incluem, mas não estão limitados a, alcanoil (p. ex., acetil, propionil, butanoil, pentanoil ou hexanoil), alquenil (p. ex., acriloil) alcinoil (p. ex., etinoil, propinoil, butinoil, pentinoil ou hexinoil) ariloílo (p. ex., benzoílo), heteroariloílo (p. ex., pirroloílo, imidazoloílo, quinoliloílo ou piridinoílo).

[0153] Como utilizado aqui, "alcoxicarbonil" refere-se a qualquer grupo alcoxi, conforme definido acima, ligado através de uma ponte de carbonil (isto é, $-C(O)O-$ -alquil). Exemplos de grupos alcoxicarbonil incluem, mas não estão limitados a isso, metoxicarbonil, etoxicarbonil, isopropoxicarbonil, n-propoxicarbonil, t-butoxicarbonil, benziloxicarbonil ou n-pentoxicarbonil.

[0154] Como utilizado aqui, "ariloxicarbonil" refere-se a qualquer grupo aril, conforme definido aqui, ligado por meio de uma ponte oxicarbonil (isto é, $-C(O)O-$ -aril). Exemplos de grupos ariloxicarbonil incluem, mas não estão limitados a isso, fenoxicarbonil e naftiloxicarbonil.

[0155] Como utilizado aqui, "heteroariloxicarbonil" refere-se a qualquer grupo heteroaril conforme definido aqui anexado através de uma ponte oxicarbonil (isto é, $-C(O)O-$ -heteroaril). Exemplos de grupos heteroariloxicarbonil incluem, mas não estão limitados a isso, 2-piridiloxicarbonil, 2-oxazoliloxicarbonil, 4-tiazoliloxicarbonil ou pirimidiniloxicarbonil.

[0156] Conforme usado aqui, "aril" ou "aromático" significa qualquer anel de carbono monocíclico ou policíclico estável de até 6 átomos em cada anel, em que pelo menos um anel é aromático. Exemplos de grupos aril incluem, mas não estão limitados a isso, fenil, naftil, antracenil, tetra-hidronaftil, indanil e bifenil. Nos casos em que o substituinte aril é bicíclico e um anel é não aromático, entende-se que a ligação se dá por meio do anel aromático. Os grupos aril são mono-, di-, tri-, tetra- ou penta-substituídos facultativamente em qualquer posição conforme permitido pela valência normal.

[0157] Conforme usado aqui, o termo "heteroaril" representa um anel monocíclico ou policíclico estável de até 7 átomos em cada anel, em que pelo menos um anel é aromático e contém de 1 a 4 heteroátomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S. Exemplos de grupos heteroaril incluem, mas não estão limitados a isso, acridinil, carbazolil, cinolinil, quinoxalinil, pirrazolil, indolil, benzotriazolil, furanil, tienil, benzotienil, benzofuranil, benzimidazolonil, benzoxazolonil, quinolinil, benzotriazolil, furanil, tienil, benzotienil, benzofuranil, benzimidazolonil, benzoxazolonil, quinolinil, isoquinilindolidol, di-hidro-indolindol, indazolil, oxazolil, oxadiazolil, isoxazolil, indolil, pirazinil, piridazinil, piridinil, pirimidinil, pirrolil e tetra-hidroquinolina. "Heteroaril" também é entendido como

incluindo o derivado N-óxido de qualquer heteroaril contendo nitrogênio. Nos casos em que o substituinte heteroaril é bicíclico e um anel é não aromático ou não contém nenhum heteroátomo, entende-se que a ligação é através do anel aromático ou através do anel contendo heteroátomo. Os grupos heteroaril são mono-, di-, tri-, tetra- ou penta-substituídos facultativamente em qualquer posição conforme permitido pela valência normal.

[0158] Como utilizado aqui, o termo "heterociclo", "heterocíclico" ou "heterociclíl" significa um heterociclo aromático ou não aromático de 3 a 14 membros contendo de 1 a 4 heteroátomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S, incluindo grupos policíclicos. Como utilizado aqui, o termo "heterocílico" também é considerado sinônimo dos termos "heterociclo" e "heterociclíl" e é entendido como tendo as mesmas definições aqui estabelecidas. "Heterociclíl" inclui os heteroarilos mencionados acima, assim como dihidro e tetrahidro análogos a estes. Exemplos de grupos heterociclíl incluem, mas não estão limitados a isso, azetidinil, benzoimidazolil, benzofuranil, benzofurazanil, benzopirazolil, benzotriazolil, benzotiofenil, benzoxazolil, carbazolil, carbolinil, cinolinil, furanil, imidanazolil, indolinil, indazolil, indazolil, isobazolil, indazolil, isoquinolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, naftpiridinilo, oxadiazolilo, oxooxazolidinilo, oxazolilo, oxazolina, oxopiperazinilo,

oxopirrolidinilo, oxomorfolinilo, isoxazolina, oxetanilo,
 piranilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo,
 piridopiridinilo, piridazinilo, piridilo, piridinonil,
 pirimidilo, pirimidinonil, pirrolilo, quinazolinilo,
 quinolilo, quinoxalinilo, tetra-hidropiranilo, tetra-
 hidrofuranilo, tetra-hidrotiopiranilo, tetra-
 hidroisoquinolinilo, tetrazolilo, tetrazolopiridilo,
 tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo, 1,4-dioxanilo,
 hexahidroazepinilo, piperazinilo, piperidinilo, piridin-2-
 onilo, pirrolidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, di-
 hidrobenzoimidazolil, dihidrobenzofuranil, di-
 hidrobenzotiofenil, dihidrobenzoxazolilo, dihidrofuranilo,
 dihidroimidazolilo, dihidroindolilo, di-hidroisooxazolil,
 di-hdroisotiazolil, di-hidrooxadiazolil, di-hidrooxazolilo,
 di-hidropirazinilo, di-hidropirazolilo, di-hidropiridinilo,
 di-hidropirimidinilo, di-hidropirrolilo, di-
 hidroquinolinilo, di-hidrotetrazolil, di-hidrotiadiazolil,
 di-hidrotiazolilo, di-hidrotienilo, di-hidrotriazolil, di-
 hidroazetidinil, dioxidotiomorfolinilo,
 metilenodioxibenzoil, tetra-hidrofuranilo e tetra-
 hidrotienilo e seus N-Óxidos. A ligação de um substituinte
 heterociclicil pode ocorrer por meio de um átomo de carbono ou
 de um heteroátomo. Os grupos heterociclicil são mono-, di-,
 tri-, tetra- ou penta-substituídos facultativamente em
 qualquer posição conforme permitido pela valência normal.

[0159] Conforme usados aqui, os termos "tratar", "tratamento" e semelhantes significam os métodos tomados ou etapas realizadas para fornecer alívio ou atenuação do número, gravidade e/ou frequência de um ou mais sintomas de uma doença em um participante do estudo. Como utilizado aqui, "tratar" e "tratamento" podem incluir prevenção, gestão, tratamento profilático e/ou inibição do número, gravidade e/ou frequência de um ou mais sintomas de uma doença em um participante do estudo.

[0160] Como utilizado aqui, a frase "entregar para uma célula" e semelhantes, quando se refere a uma molécula transportadora, significa entregar funcionalmente a molécula transportadora à célula. A frase "entrega funcional" significa entregar a molécula transportadora à célula de tal modo que permita que a molécula transportadora tenha a atividade biológica esperada. Quando se referir especificamente a uma molécula transportadora que é um agente de RNAi, a atividade biológica esperada é, por exemplo, a inibição específica da sequência da expressão do gene.

[0161] A menos que indicado em contrário, o uso do símbolo  conforme usado aqui significa que qualquer grupo ou grupos podem estar ligados a este que está de acordo com o escopo das invenções descritas aqui.

[0162] Conforme usado aqui, o termo "isômeros" refere-se a compostos que têm fórmulas moleculares idênticas, mas que

diferem na natureza ou na sequência de ligação de seus átomos ou no arranjo de seus átomos no espaço. Os isômeros que diferem no arranjo de seus átomos no espaço são chamados de "estereoisômeros". Os estereoisômeros que não são imagens espelhadas uns dos outros são denominados "diastereoisômeros"; já os estereoisômeros que são imagens espelhadas não sobrepostas são denominados "enantiômeros" ou, às vezes, isômeros ópticos. Um átomo de carbono ligado a quatro substituintes não idênticos é denominado um "centro quiral".

[0163] Como utilizado aqui, um grupo de ligação são um ou mais átomos que conectam uma molécula ou porção de uma molécula a outra à segunda molécula ou segunda porção de uma molécula. Na técnica, os termos grupo de ligação e espaçadores são algumas vezes usados indistintamente. Da mesma forma, conforme usado na técnica, o termo andaime é algumas vezes usado indistintamente com um grupo de ligação. Em algumas modalidades. Em algumas modalidades, um grupo de ligação pode incluir ou consistir em um grupo de PEG ou parte de PEG.

[0164] Como utilizado aqui, o termo "ligado" ou "conjugado", quando se refere à conexão entre duas moléculas, significa que duas moléculas são unidas por uma ligação covalente ou que duas moléculas são associadas por meio de ligações não covalentes (p. ex., ligações de hidrogênio ou ligações iônicas). Em alguns exemplos, onde o termo "ligado"

se refere à associação entre duas moléculas por meio de ligações não covalentes, a associação entre as duas moléculas diferentes tem um K_D inferior a 1×10^{-4} M (por exemplo, inferior a 1×10^{-5} M, menos de 1×10^{-6} M, ou menos de 1×10^{-7} M) em tampão fisiologicamente aceitável (por exemplo, solução salina tamponada com fosfato). A menos que indicado, o termo ligado conforme usado aqui pode referir-se à conexão entre um primeiro composto e um segundo composto com ou sem quaisquer átomos ou grupos de átomos intermediários.

[0165] A pessoa com conhecimento comum da técnica compreenderia e avaliaria facilmente que os compostos e composições divulgados aqui podem ter certos átomos (p. ex., átomos de N, O ou S) em um estado protonado ou deprotonados, dependendo do ambiente em que o composto ou a composição são colocados. Consequentemente, como utilizadas aqui, as estruturas divulgadas aqui consideram que certos grupos funcionais, tais como, por exemplo, OH, SH ou NH, podem ser protonados ou deprotonados. A divulgação aqui se destina a cobrir os compostos e composições divulgados, independentemente de seu estado de protonação baseado no pH do ambiente, como seria facilmente compreendido por uma pessoa com conhecimento comum da técnica.

[0166] Conforme usado em uma reivindicação aqui, a frase "consistindo em" exclui qualquer elemento, etapa ou ingrediente não especificado na reivindicação. Quando usada

em uma reivindicação aqui, a frase "consistindo essencialmente em" limita o escopo de uma reivindicação aos materiais ou etapas especificados e aqueles que não afetam materialmente as características básicas e novas da invenção reivindicada.

[0167] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos neste documento têm o mesmo significado que comumente compreendidos por versados na técnica à qual pertence essa invenção. Embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos aqui possam ser usados na prática ou no teste da presente invenção, os métodos e materiais adequados estão descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes e outras referências aqui mencionadas são incorporadas por referência em sua totalidade. Em caso de conflito, a presente especificação, incluindo definições, prevalecerá. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são somente ilustrativos e não se destinam a ser limitantes.

Ligas de integrina $\alpha v\beta 3$ multidentadas e andaimes

[0168] Conforme divulgado aqui, em algumas modalidades, um ou mais ligantes de integrina $\alpha v\beta 3/5$ podem ser ligados a uma ou mais moléculas transportadoras. Em algumas modalidades, somente um ligante de integrina é conjugado com uma molécula transportadora (referida aqui como um ligante "monodentado" ou "monovalente"). Em algumas modalidades, dois ligantes de integrina são conjugados com uma molécula

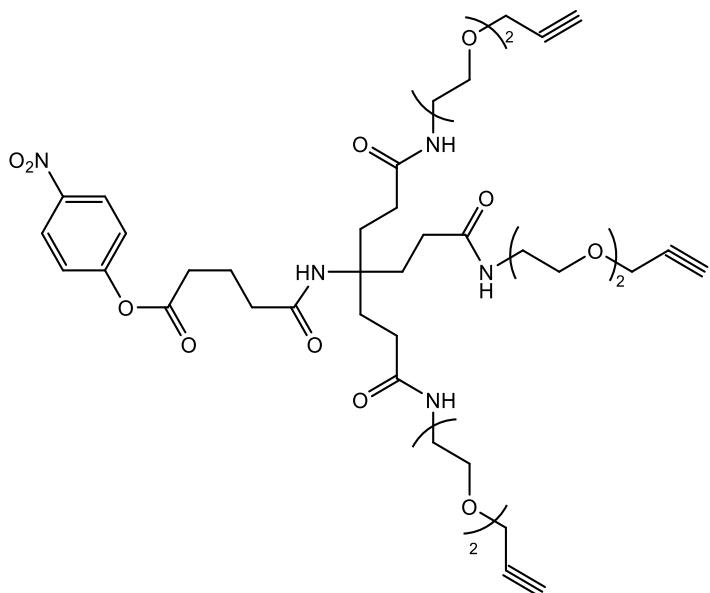
transportadora (referida aqui como um grupo de direcionamento "bidentado" ou "divalente"). Em algumas modalidades, três ligantes de integrina são conjugados com uma molécula transportadora (aqui referida como um grupo de direcionamento "tridentado" ou "trivalente"). Em algumas modalidades, quatro ligantes de integrina são conjugados com uma molécula transportadora (aqui referida como um grupo de direcionamento "tetradentado" ou "tetravalente"). Em algumas modalidades, mais de quatro ligantes de integrina são conjugados com uma molécula transportadora.

[0169] Em algumas modalidades, onde somente um ligante de integrina é conjugado com uma molécula transportadora (aqui referida como um ligante "monodentado"), o ligante de integrina pode ser conjugado diretamente com a molécula transportadora. Em algumas modalidades, um ligante de integrina divulgado aqui pode ser conjugado com uma molécula transportadora por meio de um andaime ou outra estrutura de ligante.

[0170] Em algumas modalidades, os ligantes de integrina divulgados aqui incluem um ou mais andaimes. Os andaimes, também às vezes referidos na técnica como grupos de ligação ou ligantes, podem ser usados para facilitar a conexão de uma ou mais moléculas transportadoras a um ou mais ligantes de integrina divulgados aqui. Andaimes úteis compatíveis com os ligantes divulgados aqui são geralmente conhecidos na técnica. Exemplos não limitativos de andaimes que podem ser

usados com os ligantes de integrina $\alpha v\beta 3$ divulgados aqui incluem, mas não estão limitados a polímeros e poliaminoácidos (p. ex., ácido bis-glutâmico, poli-L-lisina etc.). Em algumas modalidades, os andaimes podem incluir ligantes ou grupos de cisteína, DBCO-PEG₁₋₂₄-NHS, Propargil-PEG₁₋₂₄-NHS e/ou DBCO multidentado e/ou partes de propargil.

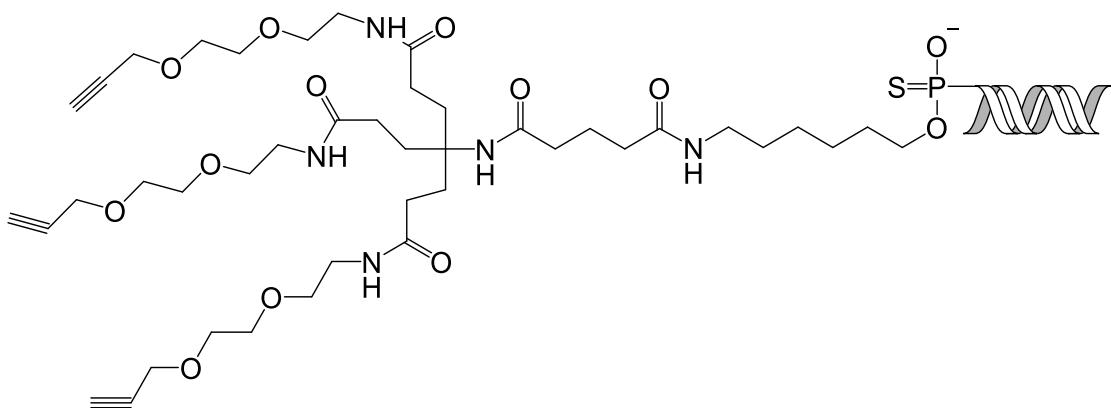
[0171] Em algumas modalidades, o andaime usado para ligar um ou mais ligantes de integrina divulgados aqui a uma ou mais moléculas transportadoras tem a seguinte estrutura:



[0172] O uso do Andaime 1, por exemplo, facilita a conjugação eficiente com os monômeros do ligante de integrina e uma ou mais moléculas transportadoras. O Andaime 1 inclui um éster *p*-nitrofenol reativo com amina (também chamado de 4-nitrofenol), uma conexão amida e três braços de unidade PEG₂, bem como alcinos terminais. O éster 4-nitrofenol pode ser conjugado com a amina primária em uma molécula transportadora, tal como a amina primária em um gatilho de

RNA formulado com um grupo amina terminal (p. ex., NH₂-(CH₂)₆), através da formação de amida. O alcino terminal pode ser conjugado com ligantes modificados com azida (tanto peptídios quanto moléculas pequenas) por meio de química de clique catalisada por cobre.

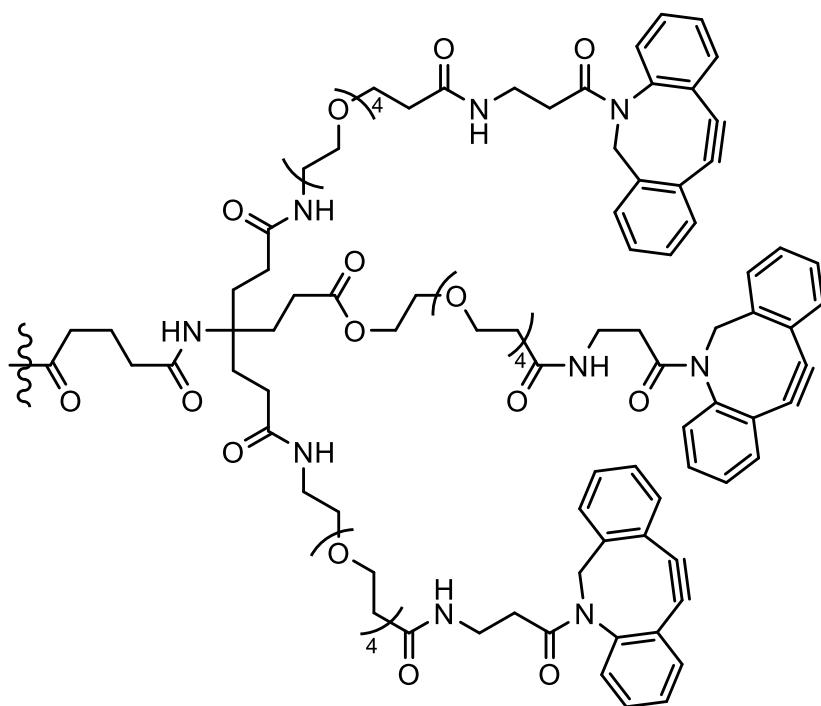
[0173] Em algumas modalidades, a molécula transportadora é um agente de RNAi. Em algumas modalidades, o Andaime 1 pode ser anexado à extremidade terminal de um agente de RNAi, tal como à extremidade 5' terminal do filamento de sentido de um agente de RNAi. Por exemplo, a extremidade 5' terminal do filamento de sentido de um agente de RNAi pode ser modificada para incluir uma amina C₆ (-(CH₂)₆-NH₂) anexada à extremidade 5' do nucleotídeo 5' terminal do agente de RNAi. Um agente de RNAi com tal modificação de amina C₆ (ou outra modificação resultando em uma amina terminal) pode ser prontamente conjugado ao Andaime 1, conforme mostrado pela representação na seguinte estrutura:



(Estrutura 380), caracterizado por indicar um agente de RNAi.

[0174] Os grupos alcino da Estrutura 380 acima podem então ser conjugados aos ligantes de integrina divulgados aqui para formar grupos de direcionamento de integrina tridentados.

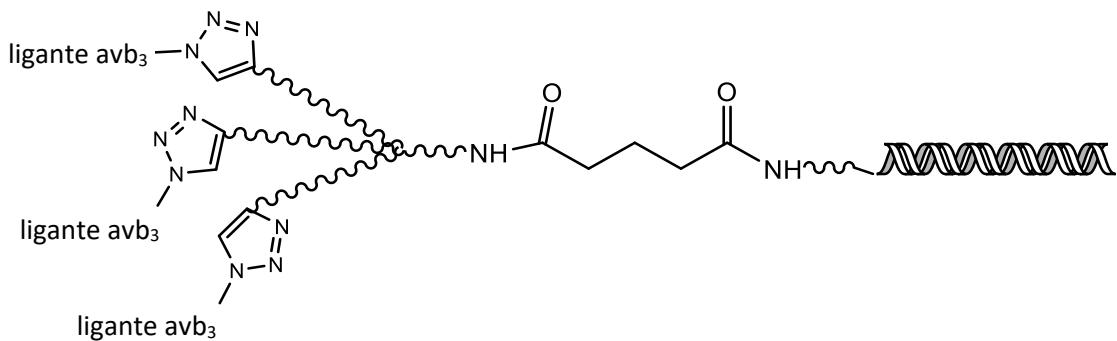
[0175] Em algumas modalidades, um andaime pode ser sintetizado usando DBCO (dibenzociclooctano), que pode ser representado pela seguinte estrutura:



(Estrutura 381),

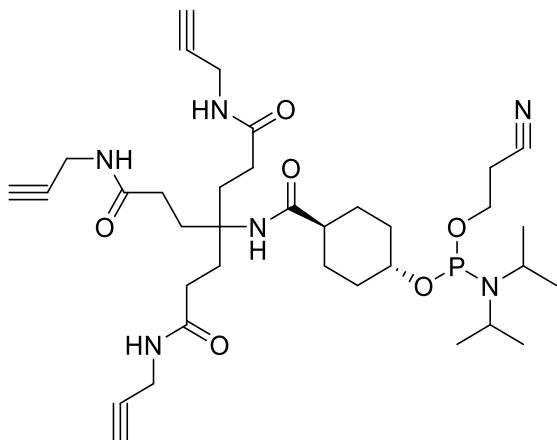
caracterizado por indicar a ligação a um grupo reativo ou uma parte que compreende a molécula transportadora.

[0176] Em algumas modalidades, os grupos triazóis são formados entre o agente de RNAi e os ligantes de integrina divulgados aqui, conforme mostrado na seguinte estrutura geral:



(Estrutura 390), caracterizado por indicar qualquer andaime ou ligante adequado que pode ser usado para ligar um ligante a um agente de RNAi e indicar um agente de RNAi.

[0177] Em algumas modalidades, um andaime pode ser sintetizado como um composto de fosforamidita, um exemplo do qual é mostrado na seguinte estrutura:



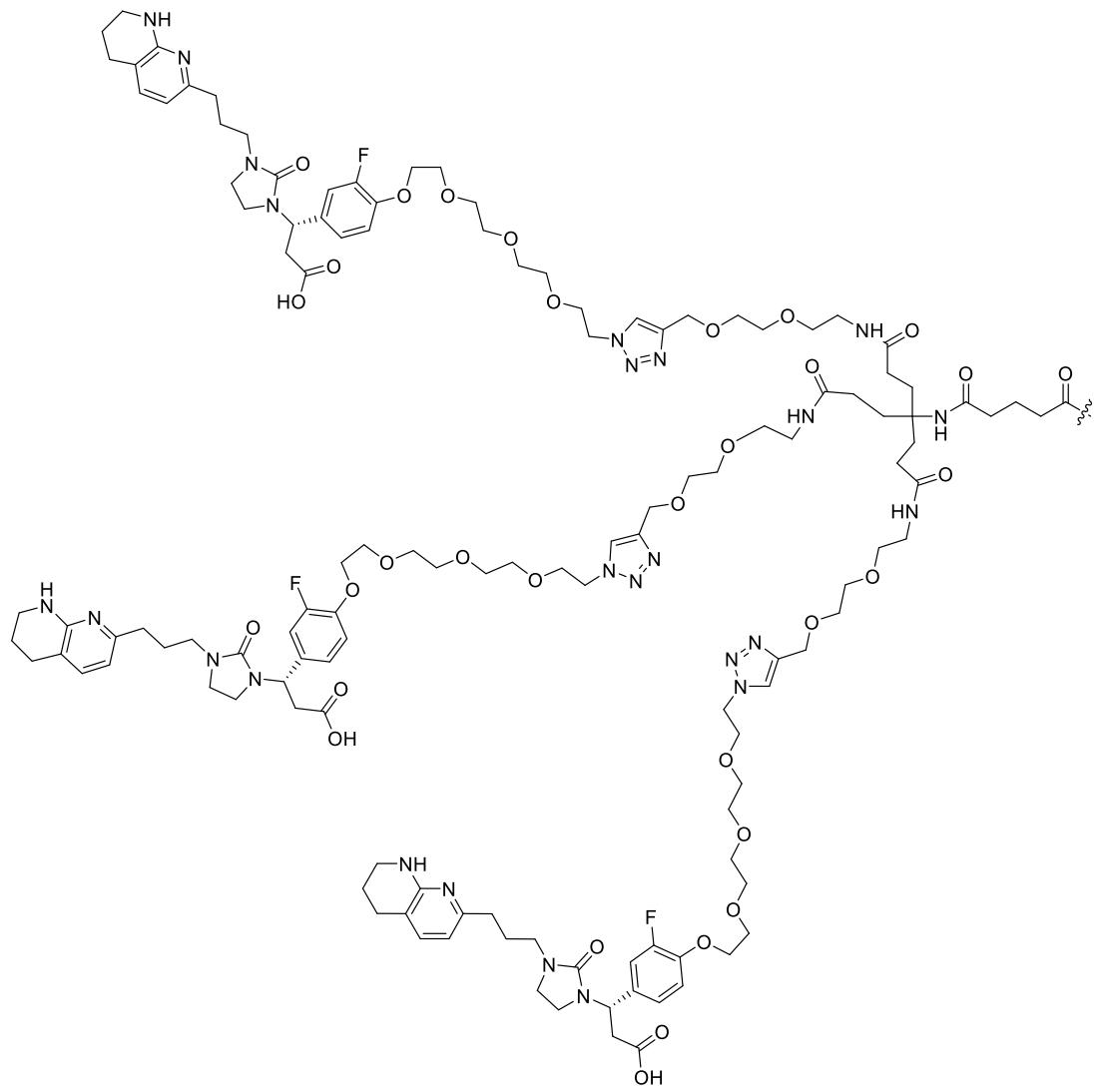
(Estrutura 400).

[0178] O composto de tri-alcino da Estrutura 400 permite que um ligante tridentado seja prontamente acoplado à extremidade 5' terminal do filamento de sentido de um agente de RNAi através de uma reação de clique de um alcino com um ligante de direcionamento compreendendo uma azida.

[0179] Em algumas modalidades, um grupo-alvo de integrina divulgado aqui compreende Estrutura 1a, Estrutura 2a,

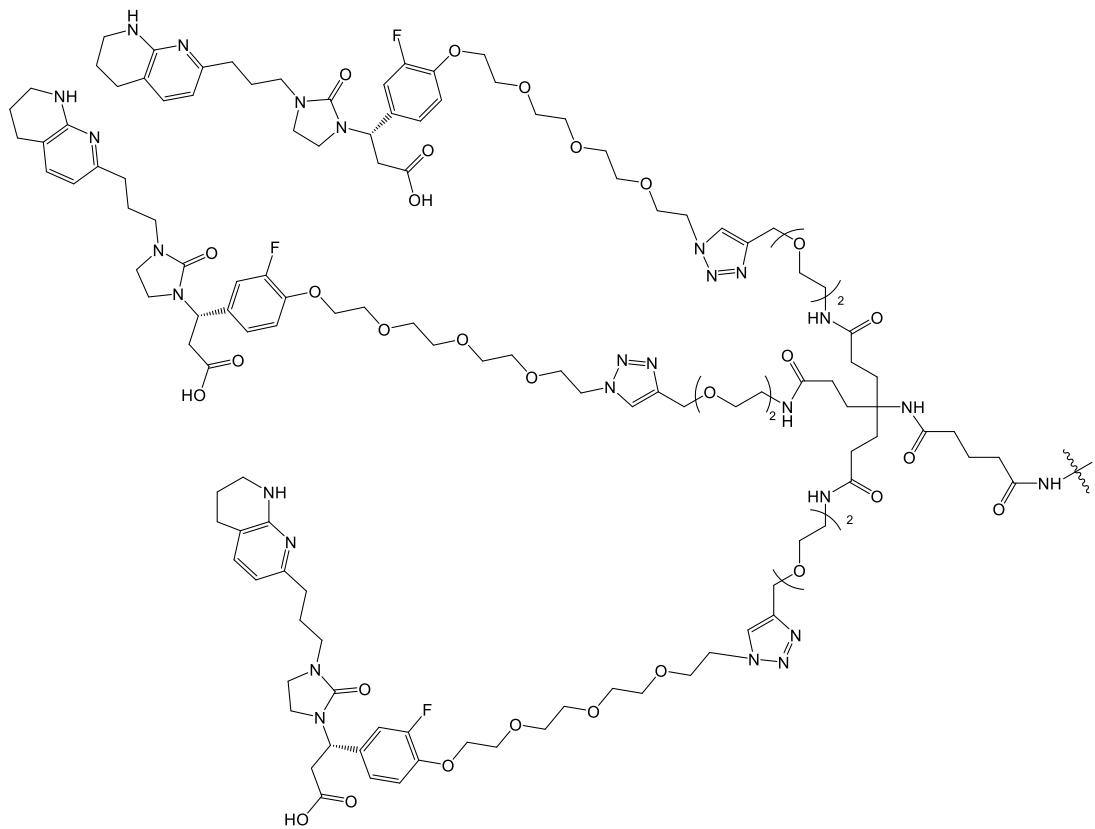
Estrutura 2.1a, Estrutura 2.2a, Estrutura 2.3a, Estrutura 2.4a, Estrutura 2.5a, Estrutura 2.6a, Estrutura 2.7a, Estrutura 2.8a, Estrutura 2.9a, Estrutura 2.10a, Estrutura 2.11a, Estrutura 28a, Estrutura 29a, Estrutura 30a, Estrutura 31a, Estrutura 32a, Estrutura 33a, Estrutura 34a, Estrutura 36a, Estrutura 37a, Estrutura 38a, Estrutura 39a, Estrutura 40a e Estrutura 41a , em que o grupo de direcionamento de integrina $\alpha v\beta 3$ é um grupo de direcionamento tridentado e comprehende três ligantes.

[0180] Em algumas modalidades, um grupo de direcionamento tridentado $\alpha v\beta 3$ divulgado aqui comprehende três ligantes da Estrutura 2a e pode ser representado pela seguinte estrutura:



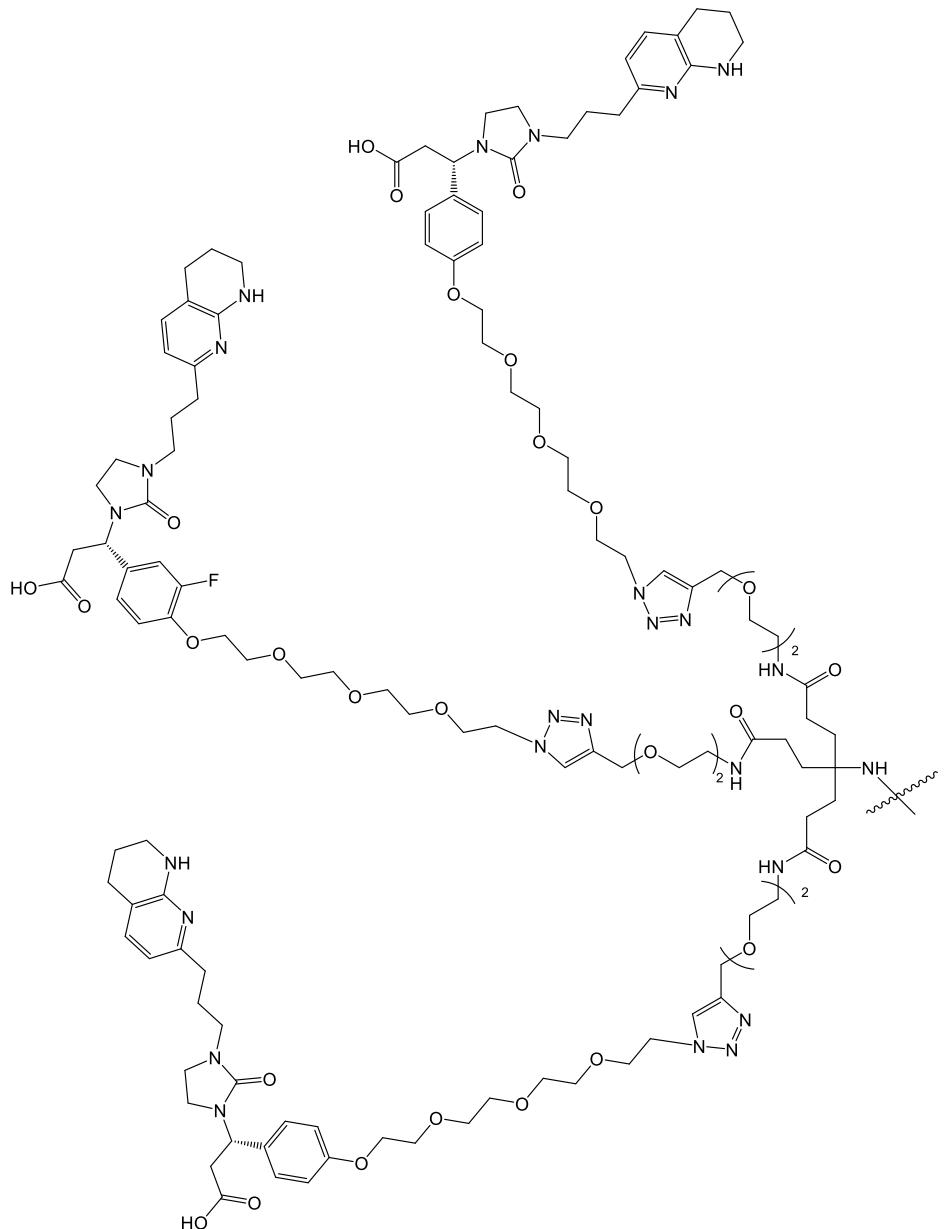
(Estrutura 700)

[0181] Em algumas modalidades, um grupo de direcionamento tridentado divulgado aqui compreende três ligantes da Estrutura 2a e pode ser representado pela seguinte estrutura:



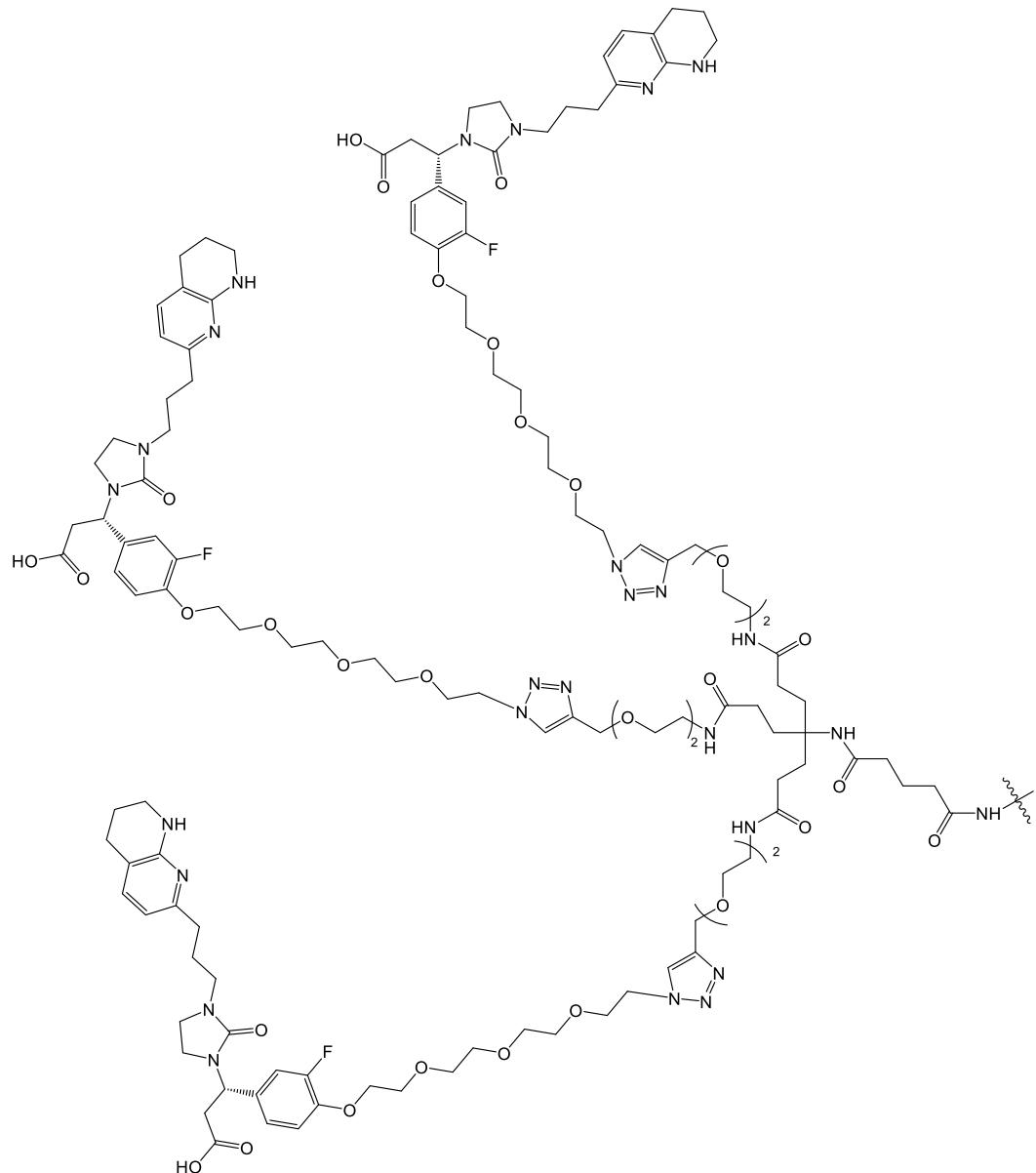
(Estrutura 701)

[0182] Em algumas modalidades, um grupo de direcionamento tridentado divulgado aqui compreende três ligantes da Estrutura 2a e pode ser representado pela seguinte estrutura:



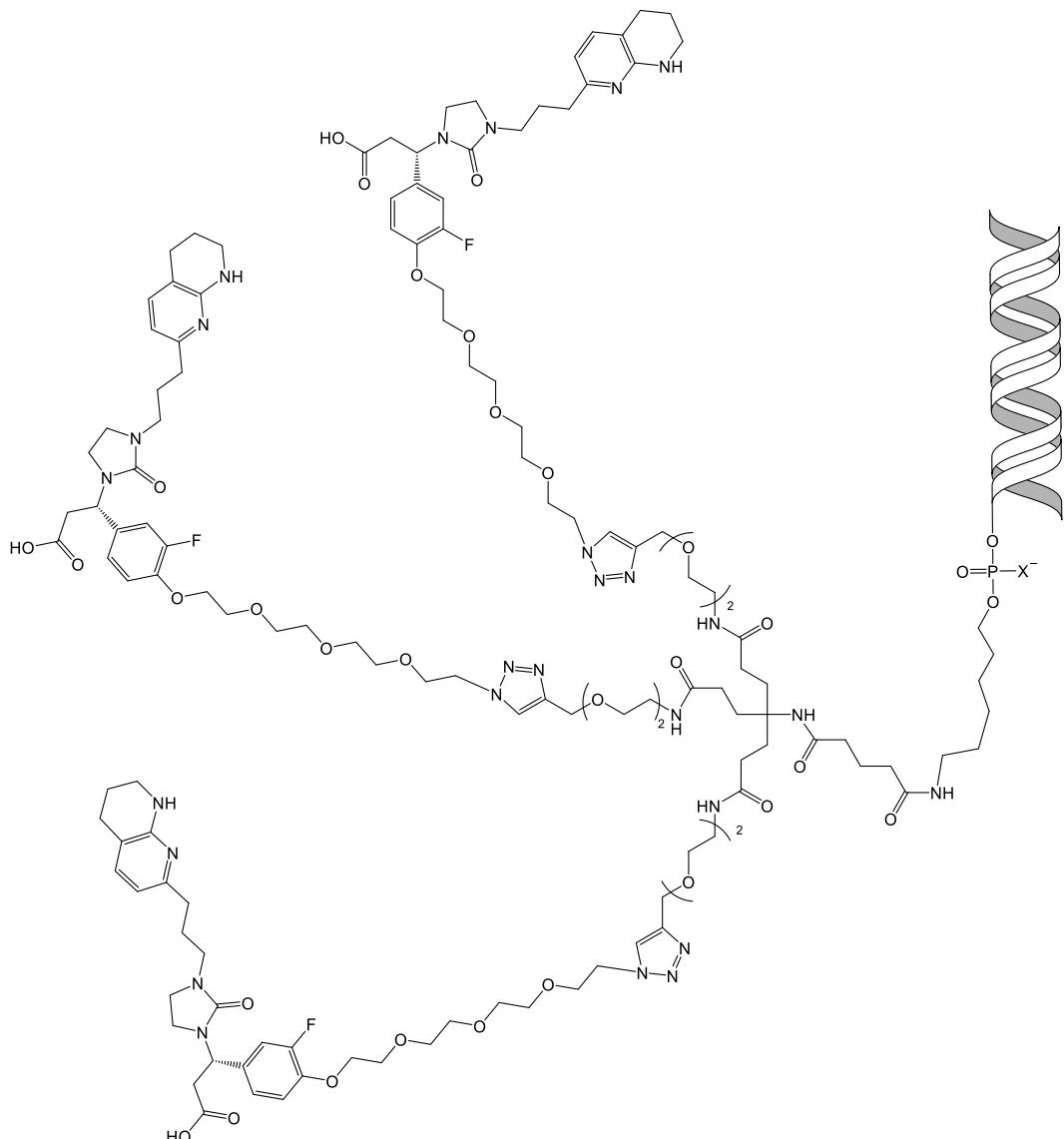
(Estrutura 701a)

[0183] Em algumas modalidades, um grupo de direcionamento tridentado compreendendo um ligante glutárico compreende três ligantes da Estrutura 2a e pode ser representado pela seguinte estrutura:



(Estrutura 701b)

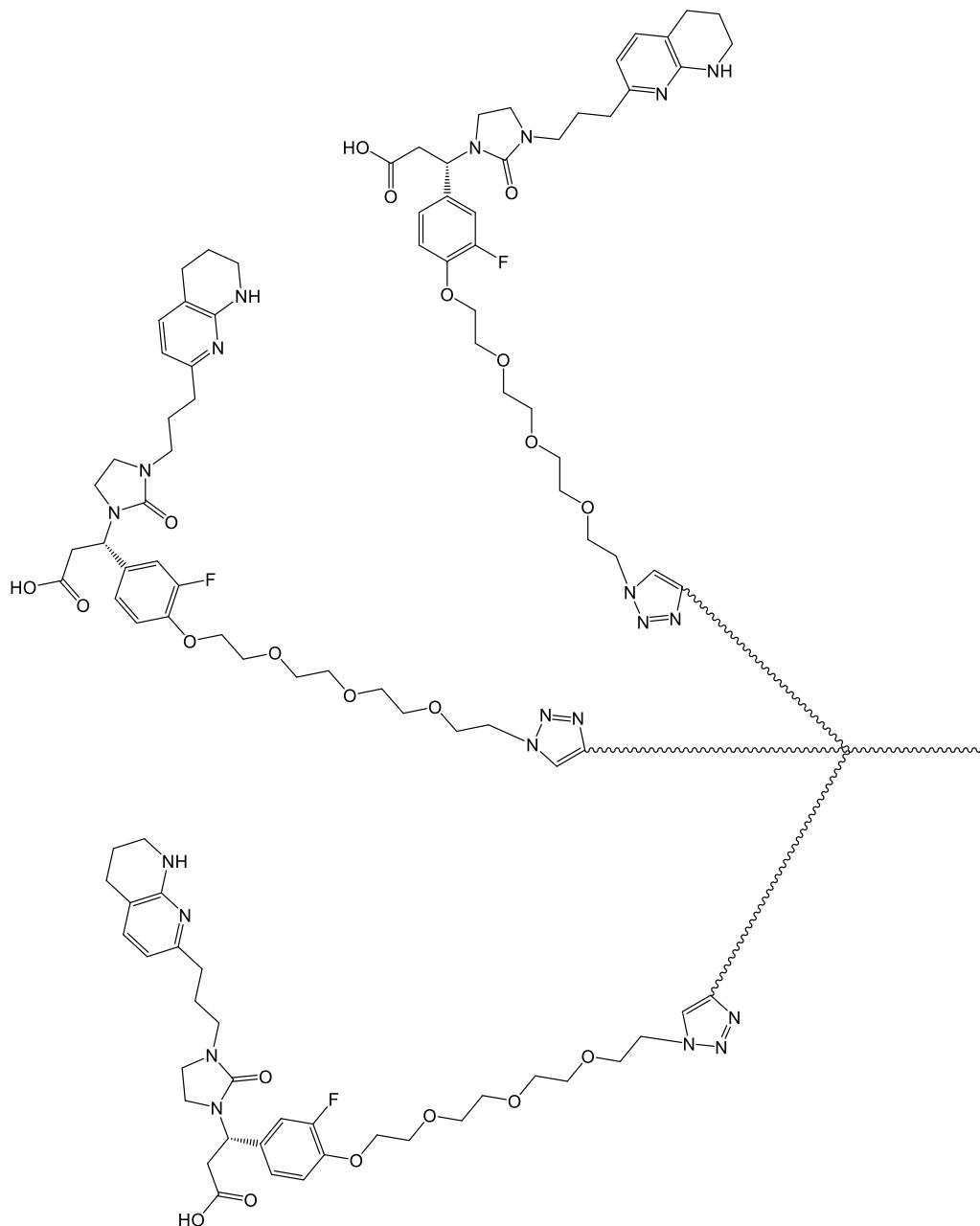
[0184] Em algumas modalidades, um grupo de direcionamento tridentado divulgado aqui compreende três ligantes da Estrutura 2a e pode ser representado pela seguinte estrutura:



(Estrutura 701c),

caracterizada por indicar um agente de RNAi e $X = O$ ou S .

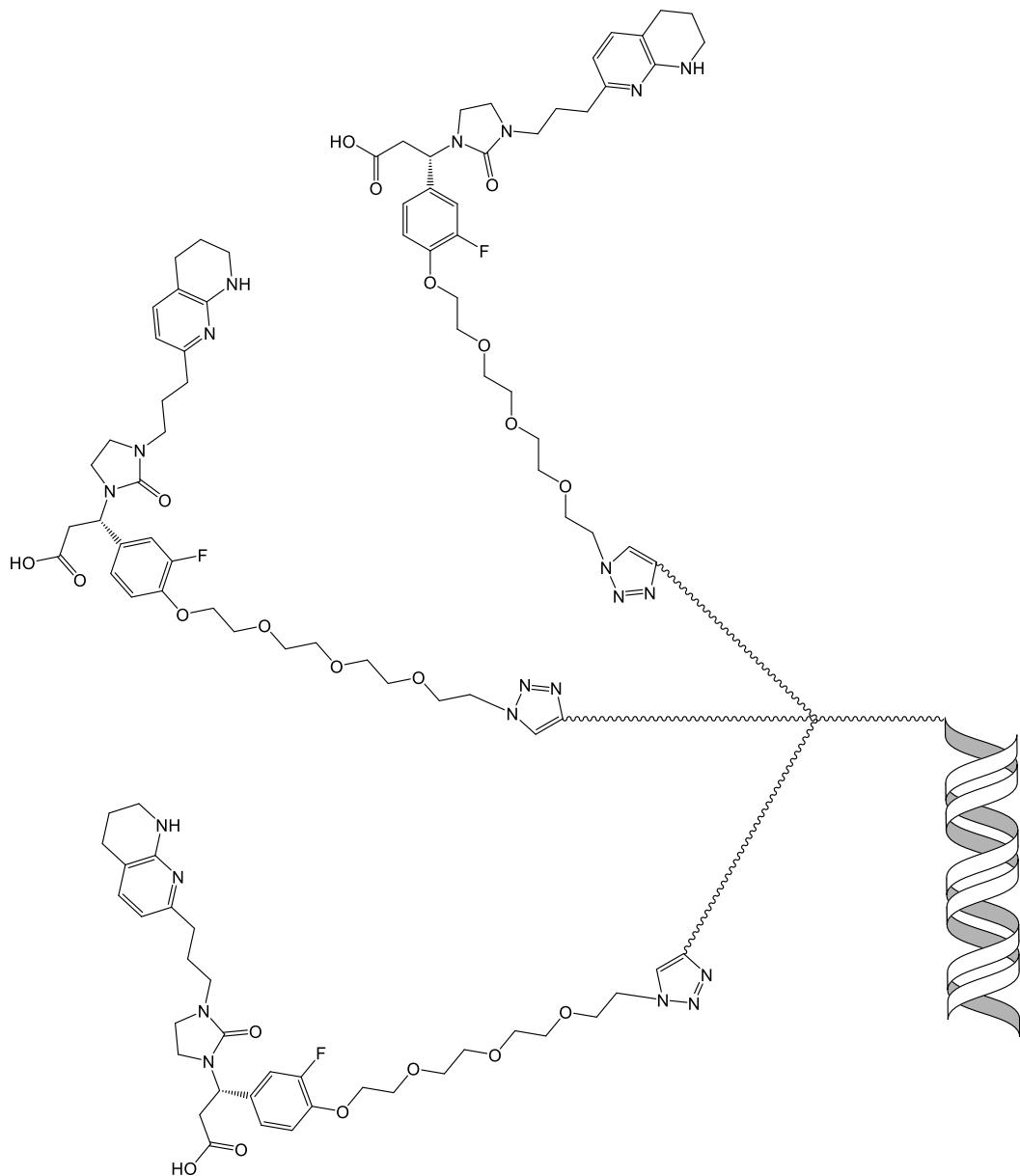
[0185] Em algumas modalidades, um grupo de direcionamento tridentado divulgado aqui compreende três ligantes da Estrutura 2a e pode ser representado pela seguinte estrutura:



(Estrutura 701d),

caracterizada por ~~~~~ indicar qualquer andaime ou ligante adequado que pode ser usado para ligar um ligante e uma molécula transportadora.

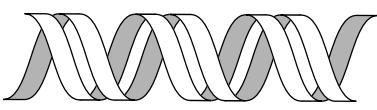
[0186] Em algumas modalidades, um grupo de direcionamento tridentado $\alpha\beta\gamma$ conjugado com um agente de RNAi compreende três ligantes da Estrutura 2a e pode ser representado pela seguinte estrutura:



(Estrutura 701e),

caracterizado por ~~~~~ indicar qualquer andaime ou ligante adequado que pode ser usado para ligar um ligante e

um agente de RNAi e



indicar um agente

de RNAi.

Grupos reativos e grupos reativos protegidos.

[0187] Os grupos reativos são bem conhecidos na técnica e proporcionam a formação de ligações covalentes entre duas moléculas ou reagentes. Grupos reativos adequados para uso no escopo das invenções aqui incluem, mas não estão limitados a isso: grupos amino, grupos amida, grupos de ácido carboxílico, azidas, alcinos, grupos propargil, BCN(biciclo[6.1.0]nonana, DBCO (dibenzociclooctano) tióis, grupos maleimida, grupos aminooxi, N-hidroxissuccinimida (NHS) ou outro éster ativado (por exemplo, PNP, TFP, PFP), grupos bromo, aldeídos, carbonatos, tosilatos, tetrazinas, trans-cicloocteno (TCO), hidrazidas, grupos hidroxila, dissulfetos e grupos dissulfeto de ortopiridila.

[0188] A incorporação de grupos reativos pode facilitar a conjugação de um ligante de integrina divulgado aqui com uma molécula transportadora. As reações de conjugação são bem conhecidas na técnica e proporcionam a formação de ligações covalentes entre duas moléculas ou reagentes. As reações de conjugação adequadas para uso no escopo das invenções aqui incluem, mas não estão limitadas a, reação de acoplamento de amida, reação de adição de Michael, reação de formação de hidrazone e reação de cicloadição química de clique.

[0189] Em algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui são sintetizados como um éster tetrafluorofenil (TFP), que pode ser deslocado por um grupo amino reativo para fixar uma molécula transportadora. Em

algumas modalidades, os ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui são sintetizados como uma azida, que pode ser conjugada a um grupo propargil ou DBCO, por exemplo, por meio de reação de cicloadição química de clique, para fixar uma molécula transportadora.

[0190] Grupos reativos protegidos também são geralmente usados na técnica. Um grupo de proteção fornece transformação química temporária de um grupo reativo em um grupo que não reage sob condições em que o grupo não protegido reage, p. ex., para fornecer quimiosseletividade em uma reação química subsequente. Grupos reativos protegidos adequados para uso no escopo das invenções aqui incluem, mas não estão limitados a isso, grupos BOC (t-butoxicarbonil), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonil), grupos carboxibenzil (CBZ), ésteres benzílicos e PBF (2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil).

Moléculas transportadoras (inclusive agentes de RNAi)

[0191] Uma molécula transportadora é qualquer molécula que, quando separada dos ligantes de integrina aqui descritos, teria um efeito desejável em uma célula compreendendo um receptor de integrina. Uma molécula transportadora pode ser, mas não está limitada a isso, um ingrediente farmacêutico, um medicamento, um pró-fármaco, uma substância com um benefício terapêutico conhecido, uma pequena molécula, um anticorpo, um fragmento de anticorpo, uma imunoglobulina, um anticorpo monoclonal, um rótulo ou

marcador, um lipídio, um ácido nucleico ou polinucleotídio natural ou modificado, um peptídeo, um polímero, uma poliamina, uma proteína, um aptâmero, uma toxina, uma vitamina, um PEG, um hapteno, uma digoxigenina, uma biotina, um átomo ou molécula radioativa ou um fluoróforo. Em algumas modalidades, uma ou mais moléculas transportadoras (por exemplo, as mesmas ou diferentes moléculas transportadoras) são ligadas a um ou mais ligantes de integrina para visar as moléculas transportadoras para uma célula que expressa integrina $\alpha v \beta 3$ e/ou integrina $\alpha v \beta 5$.

[0192] Em algumas modalidades, uma ou mais moléculas transportadoras são um ingrediente farmacêutico ou composição farmacêutica. Em algumas modalidades, uma ou mais moléculas transportadoras é um composto à base de oligonucleotídios. Como utilizado aqui, um "composto à base de oligonucleotídios" é uma sequência de nucleotídios contendo cerca de 10-50 nucleotídios ou pares de bases de nucleotídios (p. ex., 10 a 48, 10 a 46, 10 a 44, 10 a 42, 10 a 40, 10 a 38, 10 a 36, 10 a 34, 10 a 32, 10 a 30, 10 a 28, 10 a 26, 10 a 24, 10 a 22, 10 a 20, 10 a 18, 10 a 16, 10 a 14, 10 a 12, 12 a 50, 12 a 48, 12 a 46, 12 a 44, 12 a 42, 12 a 40, 12 a 38, 12 a 36, 12 a 34, 12 a 32, 12 a 30, 12 a 28, 12 a 26, 12 a 24, 12 a 22, 12 a 20, 12 a 18, 12 a 16, 12 a 14, 14 a 50, 14 a 48, 14 a 46, 14 a 44, 14 a 42, 14 a 40, 14 a 38, 14 a 36, 14 a 34, 14 a 32, 14 a 30, 14 a 28, 14 a 26, 14 a 24, 14 a 22, 14 a 20, 14 a 18, 14 a 16, 16 a 50, 16 a

48, 16 a 46, 16 a 44, 16 a 42, 16 a 40, 16 a 38, 16 a 36, 16 a 34, 16 a 32, 16 a 30, 16 a 28, 16 a 26, 16 a 24, 16 a 22, 16 a 20, 16 a 18, 18 a 50, 18 a 48, 18 a 46, 18 a 44, 18 a 42, 18 a 40, 18 a 38, 18 a 36, 18 a 34, 18 a 32, 18 a 30, 18 a 28, 18 a 26, 18 a 24, 18 a 22, 18 a 20, 20 a 50, 20 a 48, 20 a 46, 20 a 44, 20 a 42, 20 a 40, 20 a 38, 20 a 36, 20 a 34, 20 a 32, 20 a 30, 20 a 28, 20 a 26, 20 a 24, 20 a 22, 22 a 50, 22 a 48, 22 a 46, 22 a 44, 22 a 42, 22 a 40, 22 a 38, 22 a 36, 22 a 34, 22 a 32, 22 a 30, 22 a 28, 22 a 26, 22 a 24, 24 a 50, 24 a 48, 24 a 46, 24 a 44, 24 a 42, 24 a 40, 24 a 38, 24 a 36, 24 a 34, 24 a 32, 24 a 30, 24 a 28, 24 a 26, 26 a 50, 26 a 48, 26 a 46, 26 a 44, 26 a 42, 26 a 40, 26 a 38, 26 a 36, 26 a 34, 26 a 32, 26 a 30, 26 a 28, 28 a 50, 28 a 48, 28 a 46, 28 a 44, 28 a 42, 28 a 40, 28 a 38, 28 a 36, 28 a 34, 28 a 32, a 28 a 30, 30 a 50, 30 a 48, 30 a 46, 30 a 44, 30 a 42, 30 a 40, 30 a 38, 30 a 36, 30 a 34, 30 a 32, 32 a 50, 32 a 48, 32 a 46, 32 a 44, 32 a 42, 32 a 40, 32 a 38, 32 a 36, 32 a 34, 34 a 50, 34 a 48, 34 a 46, 34 a 44, 34 a 42, 34 a 40, 34 a 38, 34 a 36, 36 a 50, 36 a 48, 36 a 46, 36 a 44, 36 a 42, 36 a 40, 36 a 38, 38 a 50, 38 a 48, 38 a 46, 38 a 44, 38 a 42, 38 a 40, 40 a 50, 40 a 48, 40 a 46, 40 a 44, 40 a 42, 42 a 50, 42 a 48, 42 a 46, 42 a 44, 44 a 50, 44 a 48, 44 a 46, 46 a 50, 46 a 48 ou 48 a 50). Em algumas modalidades, um composto à base de oligonucleotídios tem uma sequência de bases nitrogenadas que é pelo menos parcialmente complementar a uma sequência de codificação em um ácido

nucleico-alvo expresso ou gene-alvo (por exemplo, o gene transrito ou mRNA de um gene-alvo) dentro de uma célula. Em algumas modalidades, os compostos à base de oligonucleotídios, após a entrega a uma célula que expressa um gene, são capazes de inibir a expressão do gene subjacente e são referidos aqui como “compostos à base de oligonucleotídios de inibição de expressão”. A expressão do gene pode ser inibida *in vitro* ou *in vivo*.

[0193] Os “compostos à base de oligonucleotídios” incluem, mas não estão limitados a isso: oligonucleotídios de filamento simples, oligonucleotídios antissentido de filamento simples, RNAs de interferência curtos ou pequenos (siRNAs), RNAs de filamento duplo (dsRNA), micro RNAs (miRNAs), RNAs short hairpin (shRNA), ribozimas, moléculas de RNA interferentes e substratos dicer. Em algumas modalidades, um composto à base de oligonucleotídios é um oligonucleotídio de filamento simples, como um oligonucleotídio antissentido. Em algumas modalidades, um composto à base de oligonucleotídios é um oligonucleotídio de filamento duplo. Em algumas modalidades, um composto à base de oligonucleotídios é um oligonucleotídio de filamento duplo que é um agente de RNAi.

[0194] Em algumas modalidades, uma ou mais moléculas transportadoras são um “agente de RNAi” que, conforme definido aqui, são uma composição química que inclui uma molécula de oligonucleotídios de RNA ou semelhante a RNA

(por exemplo, RNA quimicamente modificado) capaz de se degradar ou inibir a tradução de transcritos de RNA mensageiro (mRNA) de um mRNA-alvo de uma maneira específica para a sequência. Como utilizado aqui, os agentes de RNAi podem operar através do mecanismo de interferência de RNA (ou seja, induzir interferência de RNA através da interação com a maquinaria da via de interferência de RNA (complexo de silenciamento induzido por RNA - RISC) de células de mamíferos), ou por qualquer(qualsquer) mecanismo(s) ou via(s) alternativo(s). Embora acredite-se que os agentes de RNAi, como esse termo é utilizado aqui, operam principalmente através do mecanismo de interferência de RNA, os agentes de RNAi divulgados não estão ligados ou limitados a qualquer via ou mecanismo particular de ação. Os agentes de RNAi divulgados aqui são compostos por um filamento de sentido e um filamento antissentido e incluem, mas não estão limitados a isso: RNAs de interferência curtos ou pequenos (siRNAs), RNAs de filamento duplo (dsRNA), micro RNAs (miRNAs), RNAs short hairpin (shRNA) e substratos dicer. O filamento antissentido dos agentes de RNAi aqui descritos é pelo menos parcialmente complementar ao mRNA sendo direcionado. Os agentes de RNAi podem incluir um ou mais nucleotídios modificados e/ou uma ou mais ligações não fosfodiéster.

[0195] Normalmente, os agentes de RNAi podem ser constituídos por pelo menos um filamento de sentido (também referido como filamento passageiro) que inclui uma primeira

sequência e um filamento antissentido (também referida como filamento guia) que inclui uma segunda sequência. O comprimento dos filamentos de sentido e antissentido de um agente de RNAi pode ser, cada um, de 16 a 49 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, os filamentos de sentido e antissentido de um agente de RNAi têm, independentemente, de 17 a 26 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, os filamentos de sentido e antissentido são, independentemente, de 19 a 26 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, os filamentos de sentido e antissentido são, independentemente, de 21 a 26 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, os filamentos de sentido e antissentido são, independentemente, de 21 a 24 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, os filamentos de sentido e antissentido de um agente são, cada um, de 21 nucleotídeos de comprimento. Os filamentos de sentido e antissentido podem ter o mesmo comprimento ou comprimentos diferentes. Os agentes de RNAi incluem uma sequência de filamento antissentido que é pelo menos parcialmente complementar a uma sequência no gene-alvo e, após a entrega a uma célula que expressa o alvo, um agente de RNAi pode inibir a expressão de um ou mais genes-alvo *in vivo* ou *in vitro*.

[0196] Os compostos baseados em oligonucleotídeos em geral (e os agentes de RNAi especificamente) podem ser constituídos por nucleotídeos modificados e/ou por uma ou

mais ligações não fosfodiéster. Como utilizado aqui, um "nucleotídeo modificado" é um nucleotídeo diferente de um ribonucleotídeo (nucleotídeo 2'-hidroxil). Em algumas modalidades, pelo menos 50% (por exemplo, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100%) dos nucleotídios são nucleotídios modificados. Como utilizado aqui, os nucleotídios modificados incluem, mas não estão limitados a, desoxirribonucleotídios, miméticos de nucleotídios, nucleotídios abásicos, nucleotídios modificados 2', nucleotídios de ligações (invertidas) 3' a 3', nucleotídios não naturais compreendendo a base, nucleotídios em ponte, ácidos peptônucleicos, miméticos de 2',3'-seco nucleotídeo (análogos de base nitrogenada desblockada, nucleotídios bloqueados, nucleotídios 3'-O-metoxi (internucleosídios ligados 2')), nucleotídios 2'-F-Arabino, 5'-Me, nucleotídeo 2'-fluoro, nucleotídios morfolino, desoxirribonucleotídios de fosfonato de vinilo, nucleotídios contendo fosfonato de vinilo e nucleotídios contendo fosfonato de ciclopropilo. Os nucleotídios modificados 2' (ou seja, um nucleotídeo com um grupo diferente de um grupo hidroxil na posição 2' do anel de açúcar de cinco membros) incluem, mas não estão limitados a isso, nucleotídios 2'-O-metil, nucleotídios 2'-desoxi-2'-fluoro, nucleotídios 2'-desoxi, nucleotídios 2'-metoxietil

(2'-O-2-metoxiletil), nucleotídeos 2'-amino e nucleotídeos 2'-alquil.

[0197] Além disso, um ou mais nucleotídeos de um composto à base de oligonucleotídeos, tal como um agente de RNAi, podem ser ligados por ligações não padrão ou estruturas (isto é, ligações internucleosídicas modificadas ou estruturas modificadas). Uma conexão internucleosídica modificada pode ser uma ligação internucleosídica covalente que não contém fosfato. As ligações internucleosídicas modificadas ou estruturas incluem, mas não estão limitados a, grupos 5'-fosforotioato, fosforotioatos quirais, tiofosfatos, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquil-fosfotriésteres, alquifosfonatos (p. ex., fosfonatos de metila ou fosfonatos de 3'-alquíleno), fosfonatos quirais, fosfinatos, fosforamidatos (p. ex., fosforamidato 3'-amino, aminoalquilfosforamidatos ou tionofosforamidatos), tionoalquil-fosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, ligações morfolino, boranofosfatos com ligações normais 3'-5', análogos ligados 2'-5' de boranofosfatos ou boranofosfatos com polaridade inversa em que os pares adjacentes de unidades de nucleosídeo são ligados 3'-5' a 5'-3' ou 2'-5' a 5'-2'.

[0198] Não é necessário que todas as posições em um determinado composto sejam uniformemente modificadas. Por outro lado, mais de uma modificação pode ser incorporada em

um único composto com base de oligonucleotídeos ou mesmo em um único nucleotídeo deste.

[0199] Em algumas modalidades, a molécula transportadora é um agente de RNAi para inibir a expressão do gene HIF-2 alfa (*EPAS1*). A molécula transportadora pode ser um agente de RNAi descrito na Publicação dos Pedidos de Patente Internacional N° WO 2016/196239 e WO 2014/134255, cada um dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

[0200] Os filamentos com sentido e antissentido do agente de RNAi podem ser sintetizados e/ou modificados por métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, a divulgação de agentes de RNAi dirigidos à inibição da expressão do gene alfa de HIF-2 pode ser encontrada, por exemplo, na Publicação do Pedido de Patente Internacional N° WO 2016/196239, que é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

[0201] Em algumas modalidades, uma ou mais moléculas transportadoras podem incluir ou consistir em uma parte de PEG que pode atuar como um intensificador ou modulador farmacocinético (PK). Em algumas modalidades, uma ou mais moléculas transportadoras podem incluir uma parte de PEG com cerca de 20-900 unidades de óxido de etileno ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$) (p. ex., 20 a 850, 20 a 800, 20 a 750, 20 a 700, 20 a 650, 20 a 600, 20 a 550, 20 a 500, 20 a 450, 20 a 400, 20 a 350, 20 a 300, 20 a 250, 20 a 200, 20 a 150, 20 a 100, 20 a 75, 20 a 50, 100 a 850, 100 a 800, 100 a 750, 100 a 700, 100 a 650,

100 a 600, 100 a 550, 100 a 500, 100 a 450, 100 a 400, 100 a 350, 100 a 300, 100 a 250, 100 a 200, 100 a 150, 200 a 850, 200 a 800, 200 a 750, 200 a 700, 200 a 650, 200 a 600, 200 a 550, 200 a 500, 200 a 450 , 200 a 400, 200 a 350, 200 a 300, 200 a 250, 250 a 900, 250 a 850, 250 a 800, 250 a 750, 250 a 700, 250 a 650, 250 a 600, 250 a 550, 250 a 500, 250 a 450, 250 a 400, 250 a 350, 250 a 300, 300 a 900, 300 a 850, 300 a 800, 300 a 750, 300 a 700, 300 a 650, 300 a 600, 300 a 550 , 300 a 500, 300 a 450, 300 a 400, 300 a 350, 350 a 900, 350 a 850, 350 a 800, 350 a 750, 350 a 700, 350 a 650, 350 a 600, 350 a 550, 350 a 500, 350 a 450, 350 a 400, 400 a 900, 400 a 850, 400 a 800, 400 a 750, 400 a 700, 400 a 650, 400 a 600, 400 a 550, 400 a 500, 400 a 450, 450 a 900, 450 a 850, 450 a 800, 450 a 750, 450 a 700, 450 a 650, 450 a 600, 450 a 550, 450 a 500, 500 a 900, 500 a 850, 500 a 800, 500 a 750, 500 a 700, 500 a 650, 500 a 600, 500 a 550, 550 a 900, 550 a 850, 550 a 800, 550 a 750, 550 a 700, 550 a 650, 550 a 600, 600 a 900, 600 a 850, 600 a 800, 600 a 750, 600 a 700, 600 a 650, 650 a 900, 650 a 850, 650 a 800, 650 a 750, 650 a 700, 700 a 900, 700 a 850, 700 a 800, 800 a 900, 850 a 900, ou 850 a 900 unidades de óxido de etileno). Em algumas modalidades, uma ou mais moléculas transportadoras consistem em uma parte de PEG com aproximadamente 455 unidades de óxido de etileno (peso molecular de cerca de 20 quilodalton (kDa)). Em algumas modalidades, uma parte de PEG

tem um peso molecular de cerca de 2 quilodaltons. Em algumas modalidades, uma parte de PEG tem um peso molecular de cerca de 20 quilodaltons. Em algumas modalidades, uma parte de PEG tem um peso molecular de cerca de 40 quilodaltons. As partes de PEG descritas aqui podem ser lineares ou ramificadas. As partes de PEG podem ser discretas (monodispersas) ou não discretas (polidispersas). As partes de PEG para utilização como molécula transportadora intensificadora de PK podem ser adquiridas comercialmente. Em algumas modalidades, uma ou mais moléculas transportadoras incluem uma parte de PEG que pode atuar como um modulador ou intensificador de PK, bem como uma molécula transportadora diferente, como um ingrediente ou composto farmaceuticamente ativo.

[0202] Os ligantes de integrina descritos incluem sais ou solvatos destes. Os solvatos de um ligante de integrina significam aduções de moléculas de solvente inertes no ligante de integrina que se formam devido à sua força de atração mútua. Os solvatos são, por exemplo, mono- ou dihidratos ou compostos de adição com álcoois como, por exemplo, com metanol ou etanol.

[0203] Grupos de aminas livres ou grupos hidroxila livres podem ser fornecidos como substituintes de ligantes de integrina com grupos de proteção correspondentes.

[0204] Os ligantes de integrina $\alpha\beta 3$ também incluem, p. ex., derivados, isto é, ligantes de integrina modificados

com, por exemplo, grupos alquil ou acil, açúcares ou oligopeptídios, que são clivados *in vitro* ou em um organismo.

[0205] Em algumas modalidades, um ligante de integrina divulgado aqui facilita a entrega de uma molécula transportadora no citosol de uma célula apresentando integrinas $\alpha v\beta 3$ e/ou $\alpha v\beta 5$ em sua superfície, seja através de endocitose mediada por ligante, pinocitose ou por outros meios. Em algumas modalidades, um ligante de integrina divulgado aqui facilita a entrega de uma molécula transportadora à membrana plasmática de uma célula apresentando integrinas $\alpha v\beta 3$ e/ou $\alpha v\beta 5$.

Composições farmacêuticas

[0206] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece composições farmacêuticas que incluem, consistem em ou consistem essencialmente em um ou mais dos ligantes de integrina divulgados aqui.

[0207] Como utilizado aqui, uma "composição farmacêutica" compreende uma quantidade farmacologicamente eficaz de um ingrediente farmacêutico ativo (API) e, facultativamente, um ou mais excipientes farmaceuticamente aceitáveis. Os excipientes farmaceuticamente aceitáveis (excipientes) são substâncias diferentes do ingrediente farmacêutico ativo (API, produto terapêutico), intencionalmente incluídas no sistema de distribuição de drogas. Os excipientes não exercem ou não se destinam a exercer um efeito terapêutico na dosagem pretendida. Os excipientes podem atuar para a) auxiliar no

processamento do sistema de distribuição de drogas durante a fabricação, b) proteger, apoiar ou aumentar a estabilidade, biodisponibilidade ou aceitabilidade do paciente do API, c) auxiliar na identificação do produto e/ou d) melhorar qualquer outro atributo da segurança geral, da eficácia, da entrega do API durante o armazenamento ou uso. Um excipiente farmaceuticamente aceitável pode ou não ser uma substância inerte.

[0208] Os excipientes incluem, mas não estão limitados a: intensificadores de absorção, antiaderentes, agentes antiespuma, antioxidantes, ligantes, agentes tamponantes, transportadores, agentes de revestimento, cores, intensificadores de entrega, polímeros de entrega, dextranso, dextrose, diluentes, desintegrantes, emulsificantes, extensores, enchimentos, sabores, deslizantes, umectantes, lubrificantes, óleos, polímeros, conservantes, soro fisiológico, sais, solventes, açúcares, agentes de suspensão, matrizes de liberação sustentada, adoçantes, agentes espessantes, agentes de tonicidade, veículos, agentes repelentes de água e agentes umectantes.

[0209] As composições farmacêuticas descritas aqui podem conter outros componentes adicionais comumente encontrados em composições farmacêuticas. Em algumas modalidades, o componente adicional é um material farmaceuticamente ativo. Os materiais farmaceuticamente ativos incluem, mas não estão limitados a: antipruriginosos, adstringentes, anestésicos

locais ou agentes anti-inflamatórios (p. ex., anti-histamínico, difenidramina etc.), droga de molécula pequena, anticorpo, fragmento de anticorpo, aptâmeros e/ou vacina.

[0210] As composições farmacêuticas também podem conter agentes conservantes, agentes solubilizantes, agentes estabilizadores, agentes umectantes, emulsionantes, adoçantes, corantes, odorantes, sais para a variação da pressão osmótica, tampões, agentes de revestimento ou antioxidantes. Também podem conter outro agente com um benefício terapêutico conhecido.

[0211] As composições farmacêuticas podem ser administradas de várias maneiras, dependendo se o tratamento local ou sistêmico é desejado e da área a ser tratada. A administração pode ser feita por qualquer meio comumente conhecido na técnica, tal como, mas não limitado a, tópico (p. ex., por um adesivo transdérmico), pulmonar (p. ex., por inalação ou insuflação de pós ou aerossóis, incluindo por nebulizador, intratraqueal, intranasal), epidérmico, transdérmico, oral ou parenteral. A administração parenteral inclui, mas não está limitada a isso, injeção ou infusão intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular; administração subdérmica (p. ex., através de um dispositivo implantado), intracraniana, intraparenquimatosas, intratecal e intraventricular. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas descritas aqui são administradas por injeção intravenosa ou infusão ou

injeção subcutânea. As composições farmacêuticas podem ser administradas por via oral, por exemplo, na forma de comprimidos, comprimidos revestidos, drágeas, cápsulas de gelatina dura ou mole, soluções, emulsões ou suspensões. A administração também pode ser realizada por via retal, por exemplo, usando supositórios; local ou percutaneamente, por exemplo, usando pomadas, cremes, géis ou soluções; ou parenteralmente, por exemplo usando soluções injetáveis.

[0212] As composições farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções aquosas estéreis (quando solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Para administração intravenosa, os veículos adequados incluem solução salina fisiológica, água bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) ou solução salina tamponada com fosfato. Deve ser estável nas condições de fabricação e armazenamento, e deve ser preservado contra a ação contaminante de microrganismos, como bactérias e fungos. O transportador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido) e suas misturas adequadas. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de surfactantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos,

por exemplo, açúcares, polialcoois (como manitol e sorbitol) e cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida ao incluir na composição um agente que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[0213] As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas ao incorporar o composto ativo na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido por esterilização por filtro. Geralmente, as dispersões são preparadas ao incorporar o composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação incluem a secagem a vácuo e a liofilização, que rende um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado de uma solução previamente esterilizada por filtração.

[0214] As formulações adequadas para administração intra-articular podem estar na forma de uma preparação aquosa estéril de qualquer um dos ligantes aqui descritos que podem estar na forma microcristalina, por exemplo, na forma de uma suspensão microcristalina aquosa. As formulações lipossomais ou sistemas poliméricos biodegradáveis também podem ser

usados para apresentar qualquer um dos ligantes aqui descritos para administração intra-articular e oftálmica.

[0215] Os compostos ativos podem ser preparados com transportadores que irão proteger o composto contra a eliminação rápida do corpo, como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes e sistemas de distribuição microencapsulados. Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis podem ser usados, tais como etileno-acetato de vinila, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Os métodos para a preparação de tais formulações serão evidentes para os especialistas na técnica. As suspensões lipossomais também podem ser usadas como veículos farmaceuticamente aceitáveis. Estas podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos pelos especialistas na técnica, por exemplo, como descrito na Patente U.S. Nº 4.522.811.

[0216] Uma composição farmacêutica pode conter outros componentes adicionais comumente encontrados em composições farmacêuticas. Esses componentes adicionais incluem, mas não estão limitados a isso: antipruriginosos, adstringentes, anestésicos locais ou agentes anti-inflamatórios (p. ex., anti-histamínico, difenidramina etc.). Como utilizado aqui, "quantidade farmacologicamente eficaz", "quantidade terapeuticamente eficaz" ou simplesmente "quantidade eficaz" refere-se à quantidade de um agente farmaceuticamente ativo

para produzir um resultado farmacológico, terapêutico ou preventivo.

[0217] Os medicamentos contendo um ligante de integrina $\alpha v\beta 3$ também são objeto da presente invenção, assim como os processos para a fabricação de tais medicamentos, cujos processos compreendem trazer um ou mais compostos contendo um ligante de integrina $\alpha v\beta 3$ e, se desejado, uma ou mais de outras substâncias com um benefício terapêutico conhecido, em uma forma farmaceuticamente aceitável.

[0218] Os ligantes de integrina descritos e composições farmacêuticas compreendendo ligantes de integrina divulgados aqui podem ser embalados ou incluídos em um kit, contêiner, pacote ou dispensador. Os ligantes de integrina e composições farmacêuticas compreendendo os ligantes de integrina podem ser embalados em seringas ou frascos pré-cheios.

Grupos de ligação, intensificadores de farmacocinética (PK), moduladores de farmacodinâmica (PD), veículos de entrega e grupos-alvo

[0219] Em algumas modalidades, um ligante $\alpha v\beta 3$ é conjugado com um ou mais grupos não nucleotídeos, incluindo, mas não se limitando a isso, um grupo de ligação, um intensificador farmacocinético (PK) (também referido como um modulador PK), um modulador farmacodinâmico (PD) , um polímero de entrega ou um veículo de entrega. O grupo não nucleotídeo pode aumentar o direcionamento, distribuição ou fixação da molécula transportadora. São divulgados aqui

exemplos de andaimes para grupos de direcionamento e grupos de ligação. O grupo não-nucleotídeo pode ser covalentemente ligado à extremidade 3' e/ou 5' do filamento de sentido e/ou antissenso. Em modalidades em que a molécula transportadora é um agente de RNAi, o agente de RNAi contém um grupo não nucleotídeo ligado à extremidade 3' e/ou 5' do filamento de sentido. Em algumas modalidades, um grupo não nucleotídico está ligado à extremidade 5' de um filamento de sentido de agente de RNAi. Um ligante de integrina divulgado aqui pode ser ligado direta ou indiretamente à molécula transportadora por meio de um ligante/grupo de ligação. Em algumas modalidades, um ligante de integrina é ligado à molécula transportadora por meio de uma ligação ou ligante lábil, clivável ou reversível.

[0220] Em algumas modalidades, um grupo não nucleotídeo aumenta as propriedades farmacocinéticas ou de biodistribuição de um agente de RNAi ou conjugado ao qual está ligado para melhorar a distribuição específica de célula ou tecido e a absorção específica de célula do agente de RNAi ou conjugado. Em algumas modalidades, um grupo não nucleotídeo aumenta ou modula as propriedades farmacodinâmicas de um agente de RNAi ou conjugado ao qual está ligado para melhorar a distribuição específica de célula ou tecido e a absorção específica de célula do agente de RNAi ou conjugado.

[0221] Os grupos de direcionamento ou partes de direcionamento aumentam as propriedades farmacocinéticas ou de biodistribuição de uma molécula transportadora à qual estão ligados para melhorar a distribuição específica da célula (incluindo, em alguns casos, específica do órgão) e absorção específica da célula (ou específica do órgão) da molécula transportadora. Em algumas modalidades, um grupo de direcionamento pode compreender um ligante $\alpha\beta\gamma$ como aqui descrito. Em algumas modalidades, um grupo-alvo compreende um ligante. Em algumas modalidades, um grupo-alvo compreende um intensificador de PK. Em algumas modalidades, um ligante de integrina $\alpha\beta\gamma$ é ligado a uma molécula transportadora usando um ligante, como um ligante PEG ou um, dois ou três resíduos abásicos e/ou ribitol (ribose abásica), que em alguns casos podem servir como ligantes. Os grupos de direcionamento podem compreender um ou mais ligantes de direcionamento. Em algumas modalidades, um grupo de direcionamento pode compreender de um a quatro ligantes de integrina divulgados aqui. Em algumas modalidades, um grupo de direcionamento é um grupo de direcionamento tridentado e compreende três ligantes de integrina divulgados aqui.

[0222] As moléculas transportadoras podem ser sintetizadas com um grupo reativo, como um grupo de aminas (também referido aqui como uma amina). Em modalidades em que a molécula transportadora é um agente de RNAi, o grupo reativo pode ser ligado no terminal 5' e/ou no terminal 3'.

O grupo reativo pode ser usado em seguida para fixar um ligante de integrina $\alpha v\beta 3$ usando métodos típicos na técnica.

[0223] Por exemplo, em algumas modalidades, um agente de RNAi é sintetizado com um grupo NH_2-C_6 no terminal 5' do filamento de sentido do agente de RNAi. O grupo de aminas terminal pode ser reagido em seguida para formar um conjugado com, por exemplo, um grupo que inclui um ligante dirigido à integrina. Em algumas modalidades, um agente de RNAi é sintetizado com um ou mais grupos alcino no terminal 5' do filamento de sentido do agente de RNAi. O(s) grupo(s) alcino(s) terminal(is) pode(m) reagir em seguida para formar um conjugado com, por exemplo, um grupo que inclui um ligante dirigido à integrina $\alpha v\beta 3$.

[0224] Em algumas modalidades, um grupo de ligação é conjugado ao ligante $\alpha v\beta 3$. O grupo de ligação facilita a conexão covalente do ligante $\alpha v\beta 3$ a uma molécula transportadora, intensificador de PK, polímero de entrega ou veículo de entrega. Exemplos de grupos de ligação incluem, mas não estão limitados a isso: Alk-SMPT-C6, Alk-SS-C6, DBCO-TEG, Me-Alk-SS-C6 e C6-SS-Alk-Me, grupos reativos, tais como aminas e alcinos primários, grupos alquil, resíduos abásicos/nucleotídios, aminoácidos, grupos tri-alcino funcionalizados, ribitol e/ou grupos de PEG.

[0225] Um ligante ou grupo de ligação é uma conexão entre dois átomos que ligam um grupo químico (como um agente de RNAi) ou segmento de interesse a outro grupo químico (como

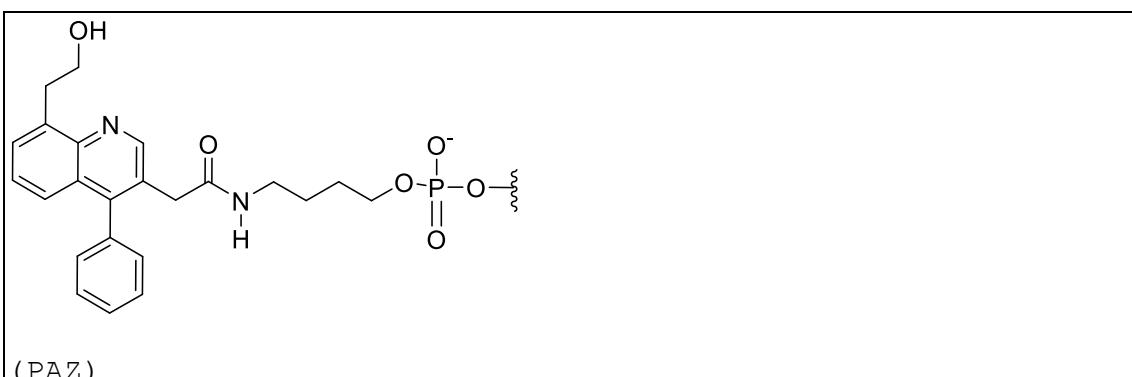
um ligante de integrina $\alpha v\beta 3$, intensificador de PK, modulador de PD ou polímero de entrega) ou segmento de interesse por meio de uma ou mais ligações covalentes. Uma conexão lábil contém uma ligação lábil. Uma conexão pode incluir facultativamente um espaçador que aumenta a distância entre os dois átomos unidos. Um espaçador pode ainda adicionar flexibilidade e/ou comprimento à conexão. Os espaçadores incluem, mas não estão limitados a isso, grupos alquil, grupos alquenil, grupos alquinil, grupos aril, grupos aralquil, grupos aralquenil e grupos aralquinil; cada um dos quais pode conter um ou mais heteroátomos, heterociclos, aminoácidos, nucleotídios e sacarídios. Os grupos espaçadores são bem conhecidos na técnica e a lista anterior não se destina a limitar o escopo da descrição.

[0226] Em algumas modalidades, os ligantes $\alpha v\beta 3$ são ligados a moléculas transportadoras sem o uso de um ligante adicional. Em algumas modalidades, o ligante $\alpha v\beta 3$ é projetado tendo um ligante imediatamente presente para facilitar a ligação a uma molécula transportadora. Em algumas modalidades, quando dois ou mais agentes de RNAi estão incluídos em uma composição, os dois ou mais agentes de RNAi podem ser ligados a seus respectivos grupos de direcionamento usando os mesmos ligantes. Em algumas modalidades, quando dois ou mais agentes de RNAi estão incluídos em uma composição, os dois ou mais agentes de RNAi são ligados a

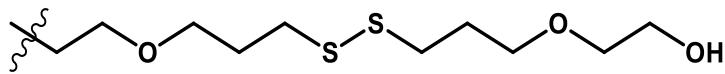
seus respectivos grupos de direcionamento usando diferentes ligantes.

[0227] Exemplos de certos grupos de ligação e andaimes são fornecidos na Tabela A.

Tabela A. Estruturas representando vários grupos de conexão e andaimes

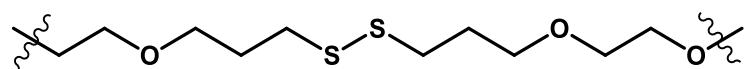
 (PAZ)		
Quando posicionado na extremidade terminal 3' do oligonucleotídeo:		
	 (C6-SS-C6)	
Quando posicionado internamente no oligonucleotídeo:		
ligante para a extremidade 5' do oligonucleotídeo	ligante para a extremidade 3' do oligonucleotídeo	
	 (C6-SS-C6)	

Quando posicionado na extremidade terminal 3' do oligonucleotídeo:



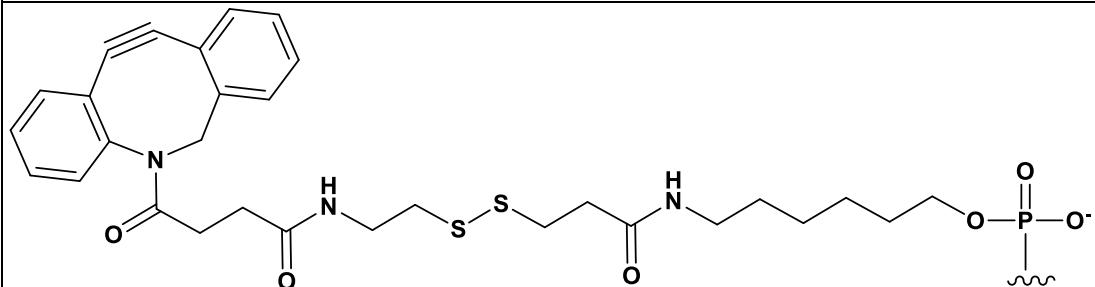
Quando posicionado internamente no oligonucleotídeo:

ligante para a extremidade 5'
do oligonucleotídeo

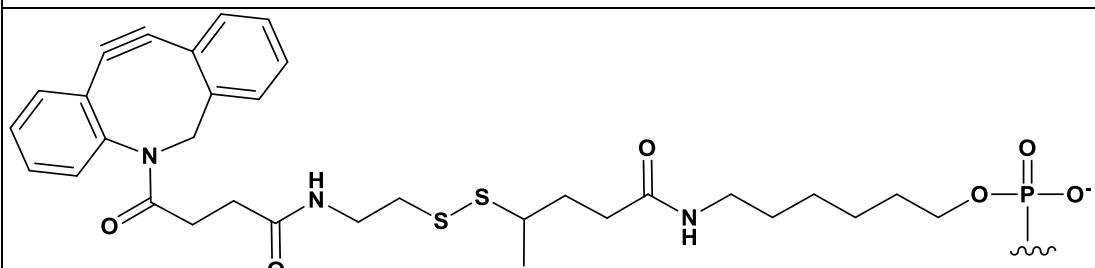


(6-SS-6)

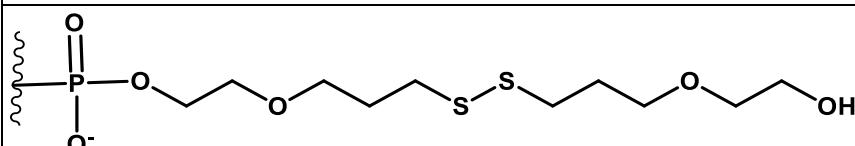
ligante para a extremidade 3'
do oligonucleotídeo



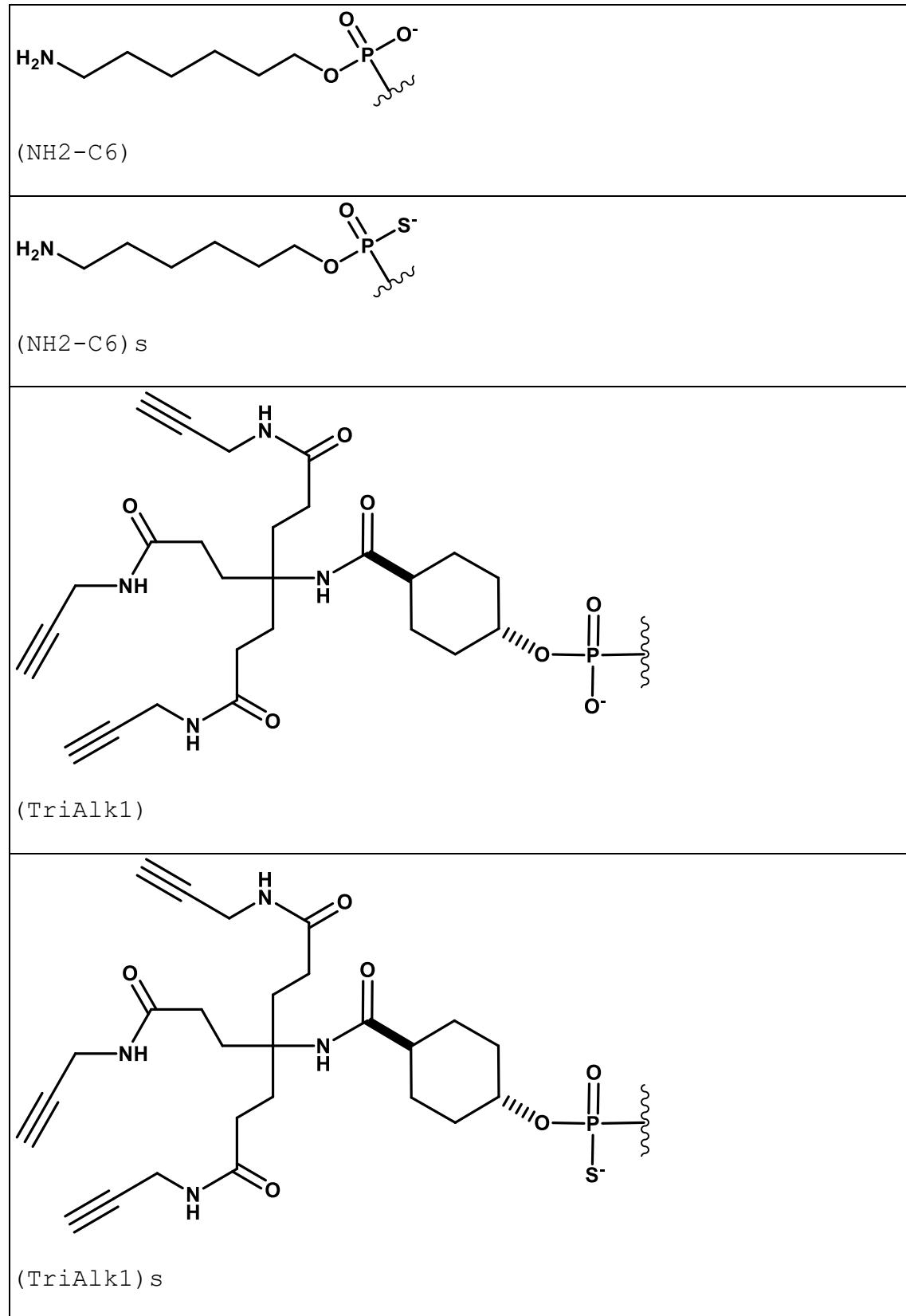
(C6-SS-Alk) ou (Alk-SS-C6)

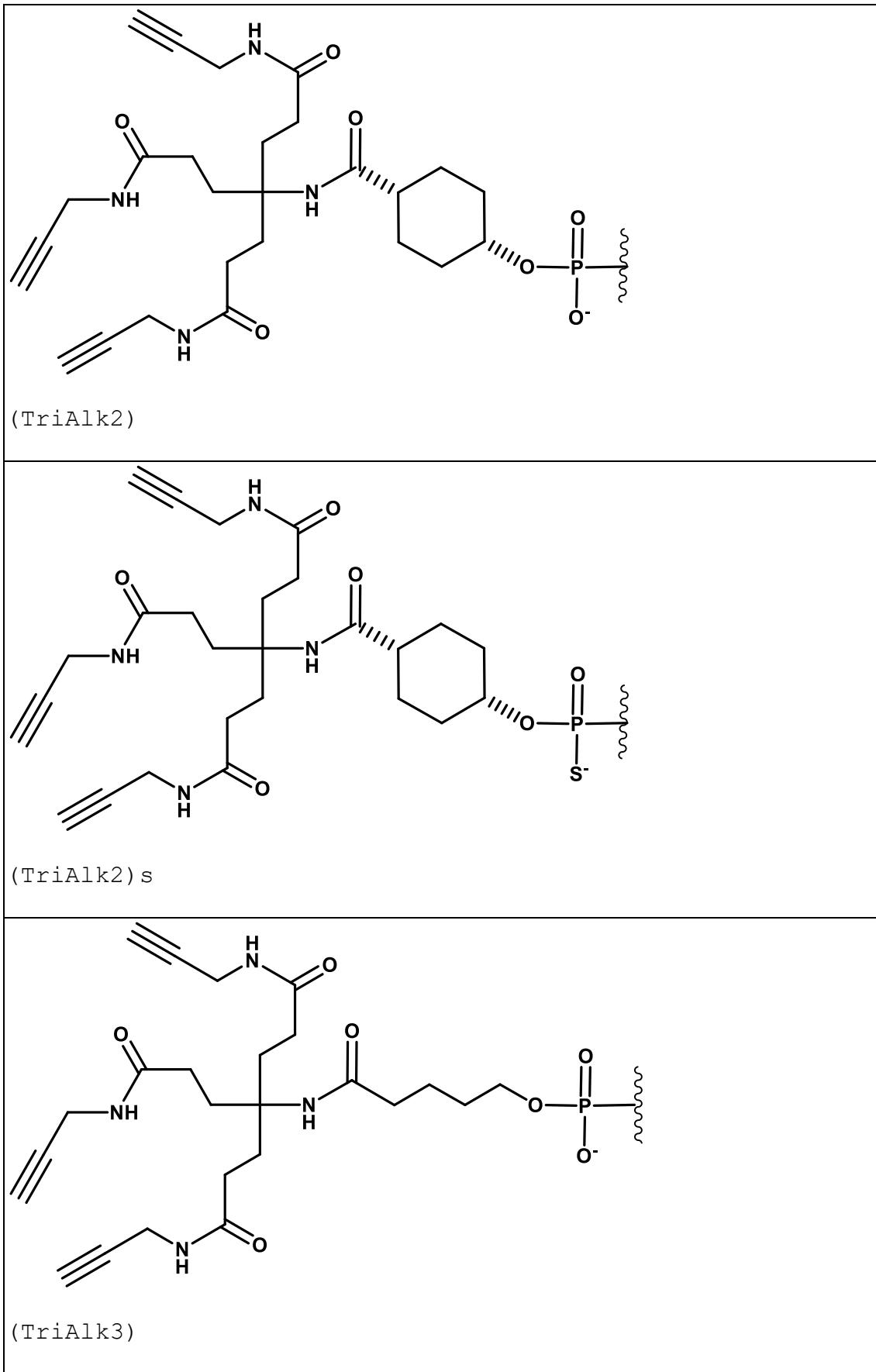


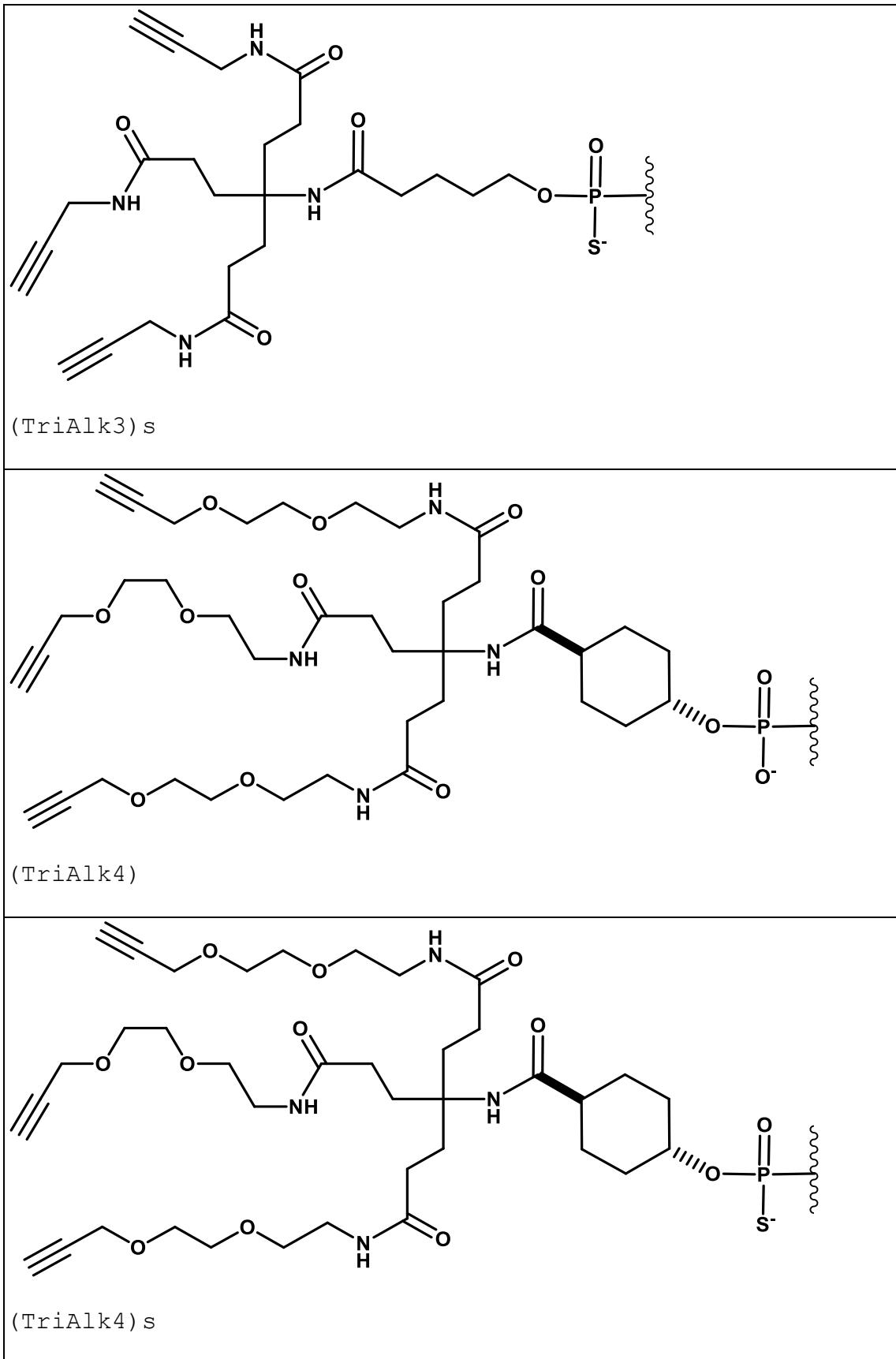
(C6-SS-Alk-Me)

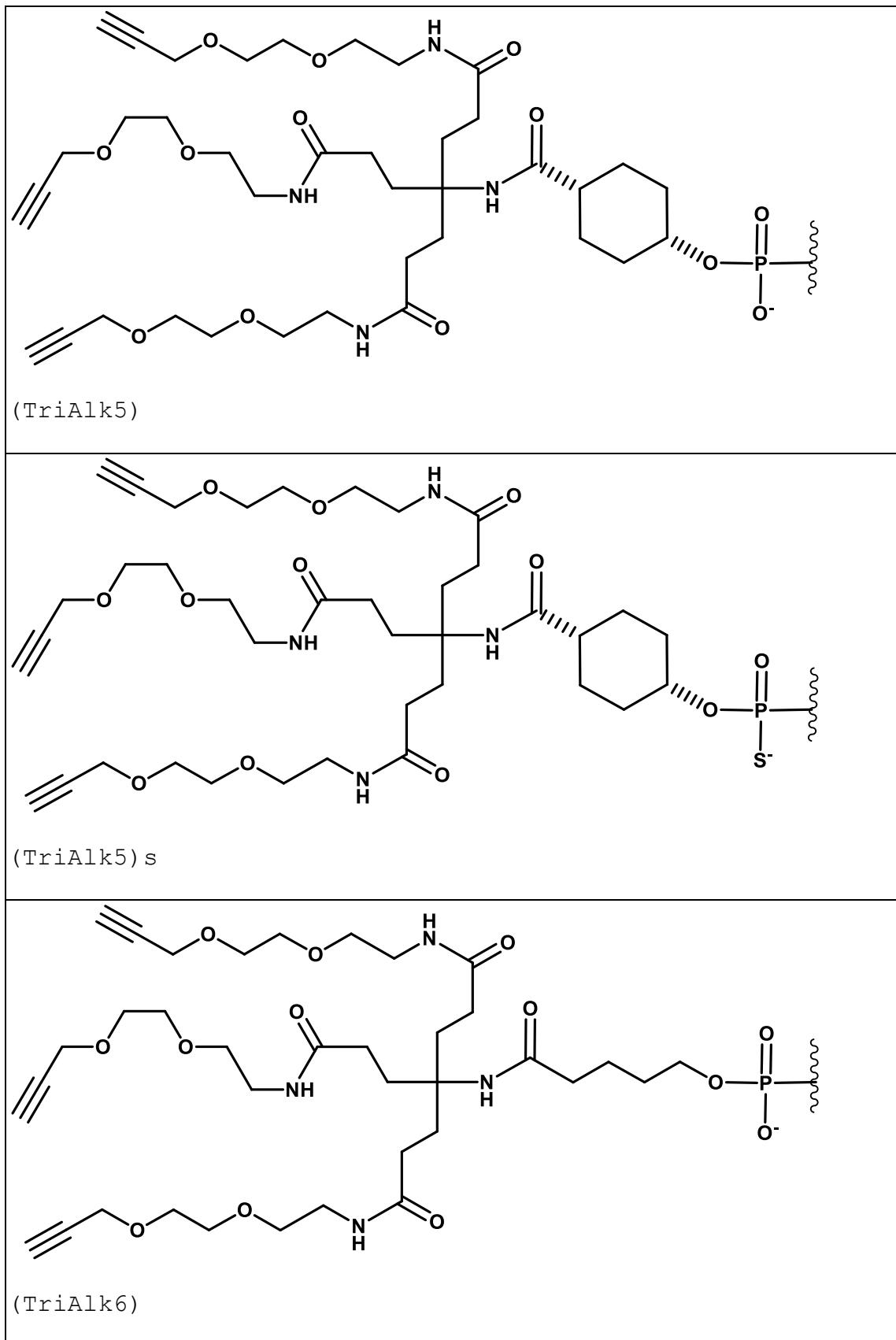


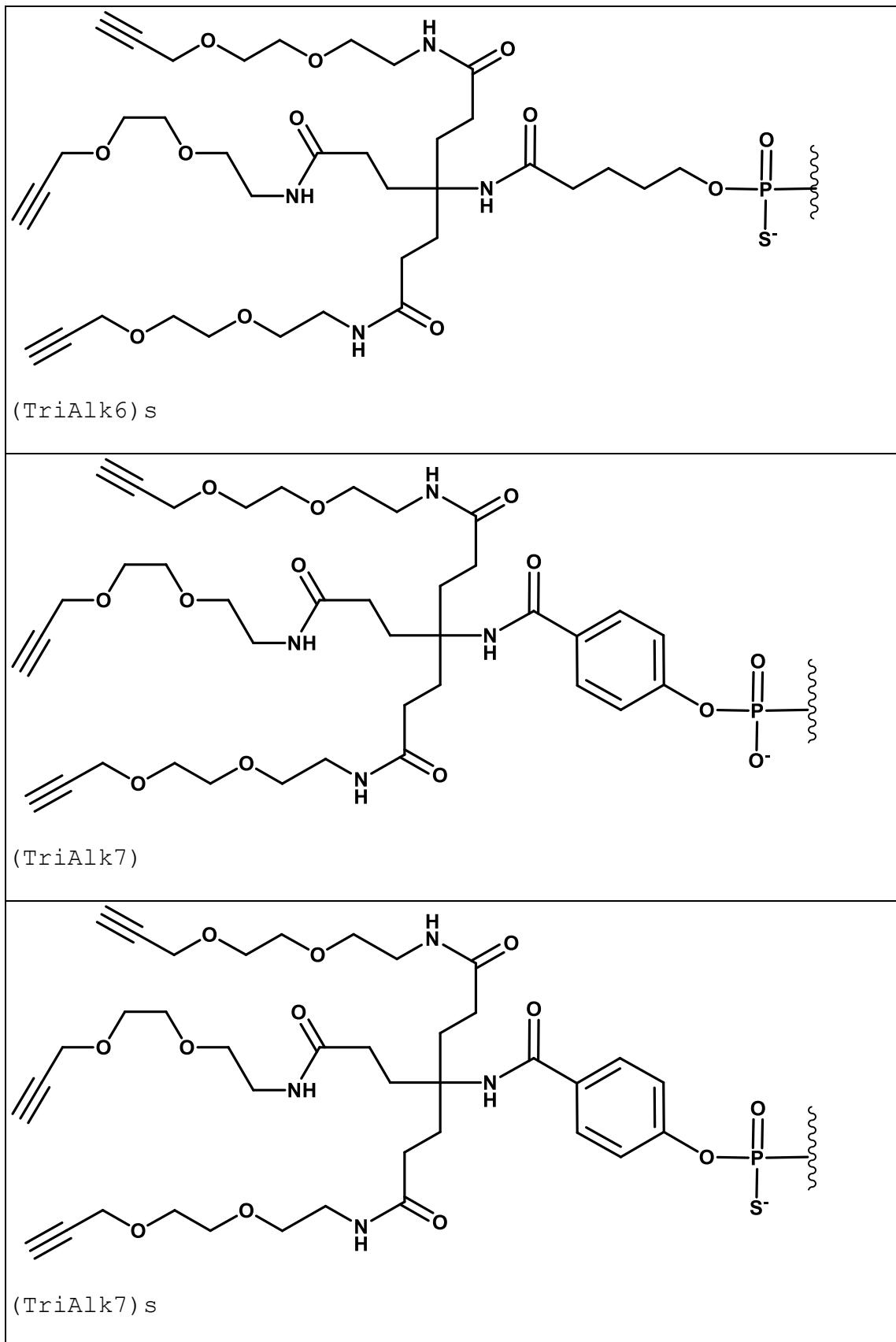
(PEG-C3-SS)

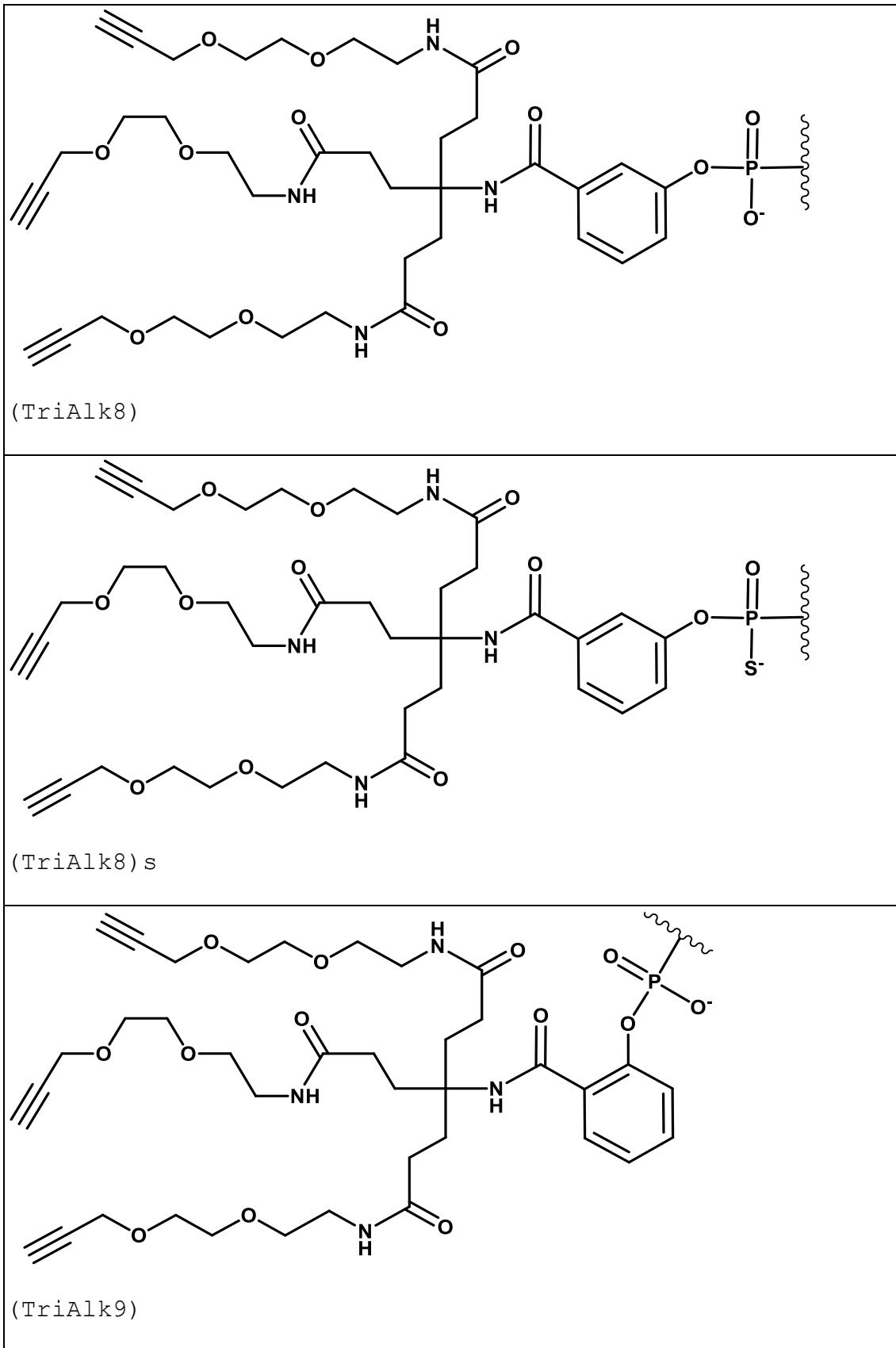


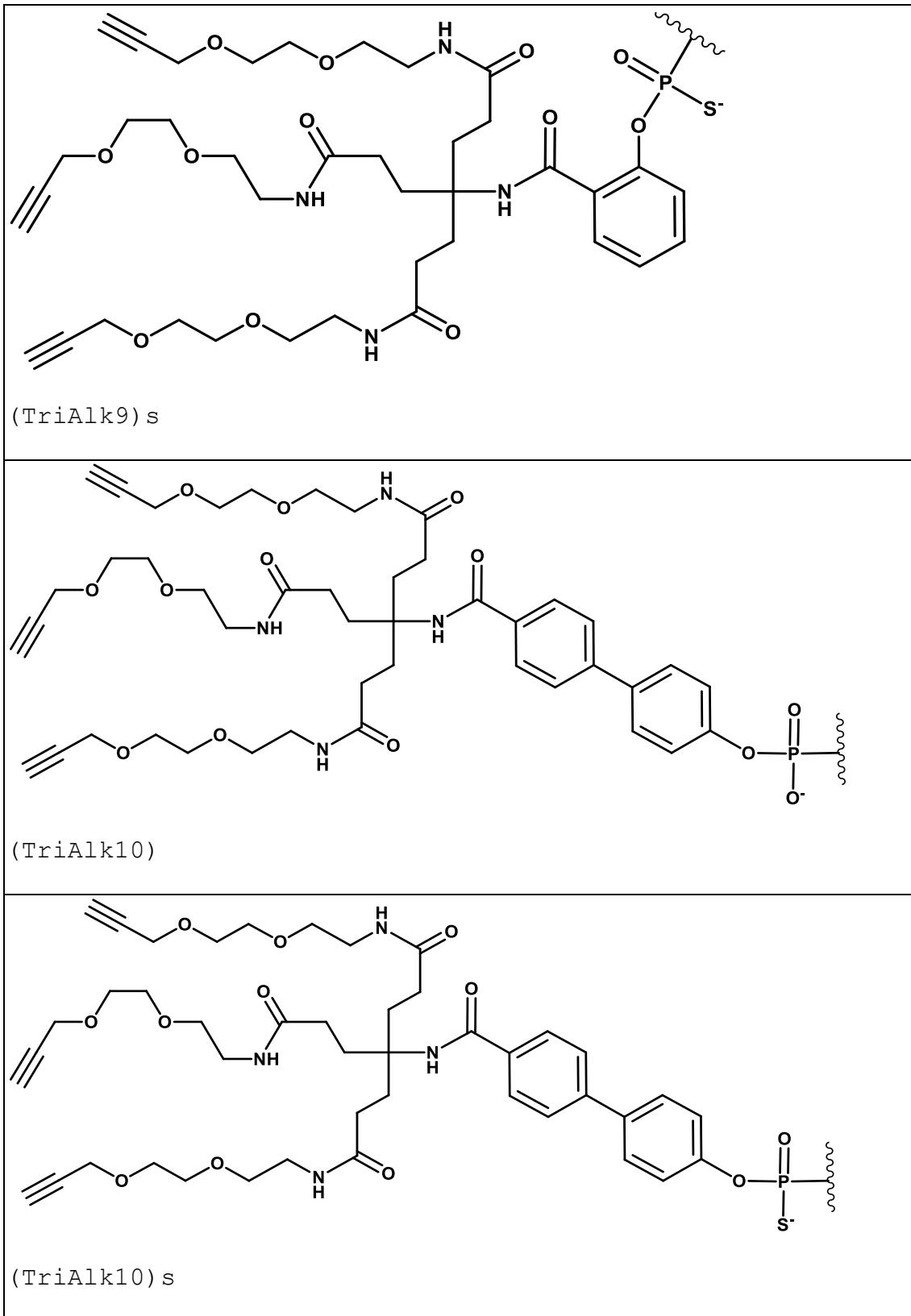


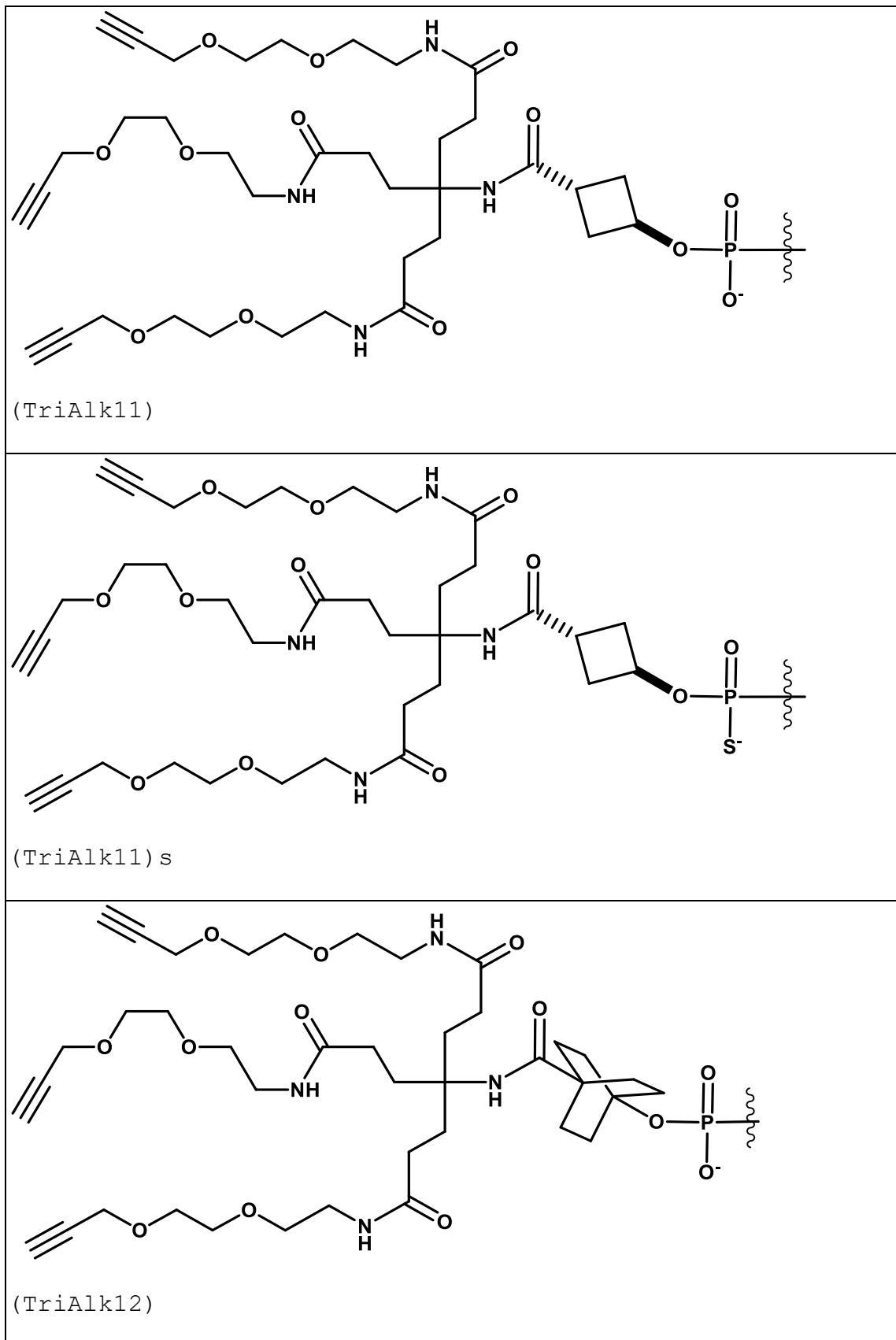


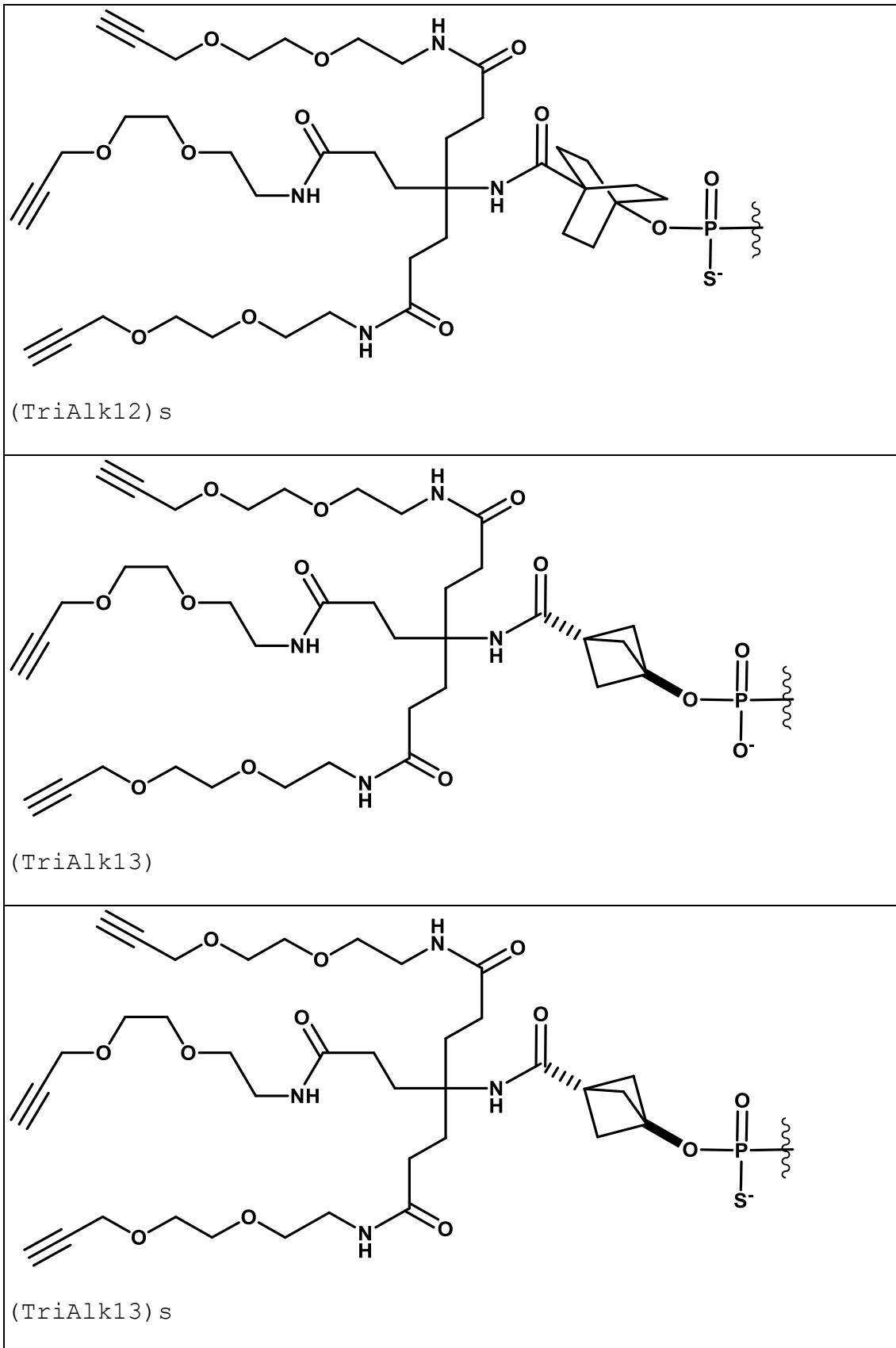


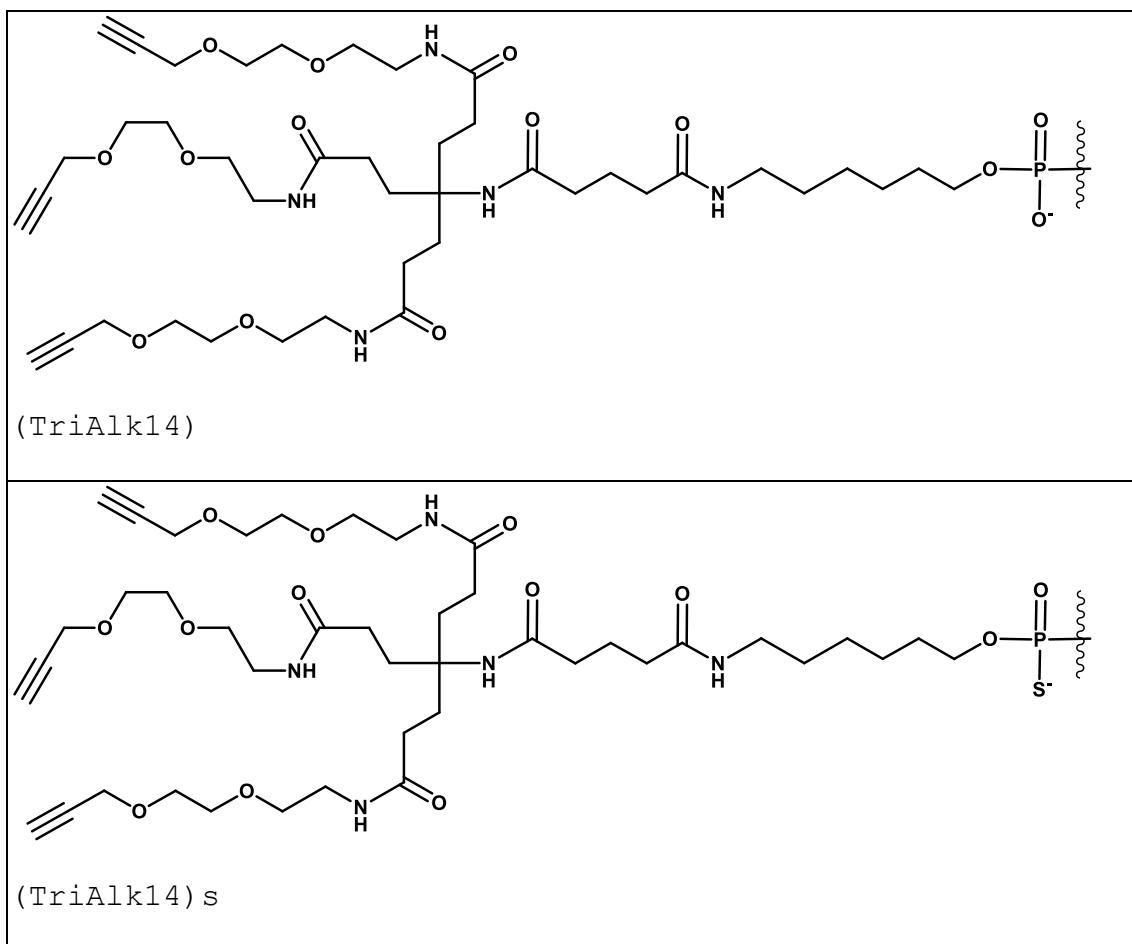












caracterizado por \sim indicar o ponto de fixação a uma molécula transportadora.

[0228] Como alternativa, podem ser usados outros grupos de ligação conhecidos na técnica. Exemplos de grupos de ligação adequados são fornecidos no Pedido PCT N° PCT/US19/18232, que é incorporado por referência aqui em sua totalidade.

[0229] As modalidades e itens fornecidos acima são agora ilustrados com os seguintes exemplos não limitativos.

Ligantes de direcionamento ligados internamente

[0230] Em algumas modalidades, quando os ligantes dirigidos à integrina descritos aqui são ligados ou ligados

a uma molécula de RNAi, o ligante dirigido à integrina pode ser ligado a nucleotídeos internos do filamento de sentido ou do filamento antissentido. Em algumas modalidades, até 15 ligantes de direcionamento podem ser conjugados com nucleotídeos internos no filamento de sentido de um agente de RNAi. Em algumas modalidades, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 ligantes de direcionamento podem ser conjugados com nucleotídeos internos no filamento de sentido de um HIF- 2 agente alfa RNAi. Em algumas modalidades, 1 a 5 (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5) ligantes de direcionamento são conjugados com nucleotídeos internos no filamento de sentido de um agente de RNAi. Em algumas modalidades, 3 a 4 ligantes de direcionamento são conjugados com nucleotídeos internos no filamento de sentido de um agente de RNAi.

[0231] Em algumas modalidades, a colocação de ligantes de direcionamento interno pode impactar a eficácia ou potência de um agente de RNAi. Em algumas modalidades de ligantes dirigidos à integrina $\alpha v \beta 3$ ligados a agentes de RNAi, um grupo de direcionamento é conjugado com a extremidade 5' do filamento de sentido e pelo menos 10 nucleotídeos são posicionados entre o grupo de direcionamento tridentado, localizado na extremidade 5' do filamento de sentido, e o próximo ligante de direcionamento mais próximo, localizado no filamento de sentido. Em algumas modalidades, pelo menos 5 nucleotídeos são posicionados entre o grupo de

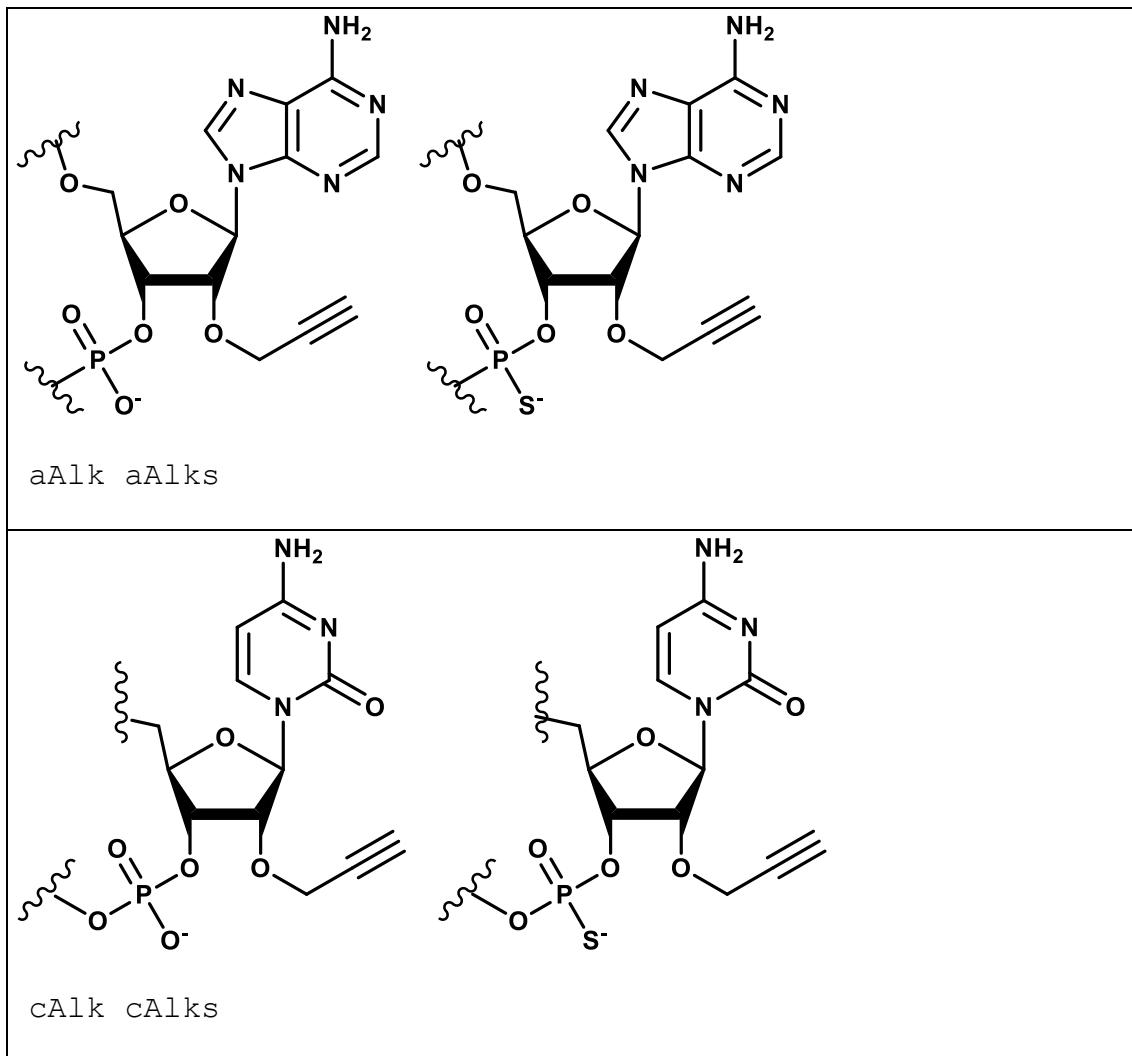
direcionamento tridentado, localizado na extremidade 5' do filamento de sentido, e o próximo ligante de direcionamento mais próximo, localizado no filamento de sentido.

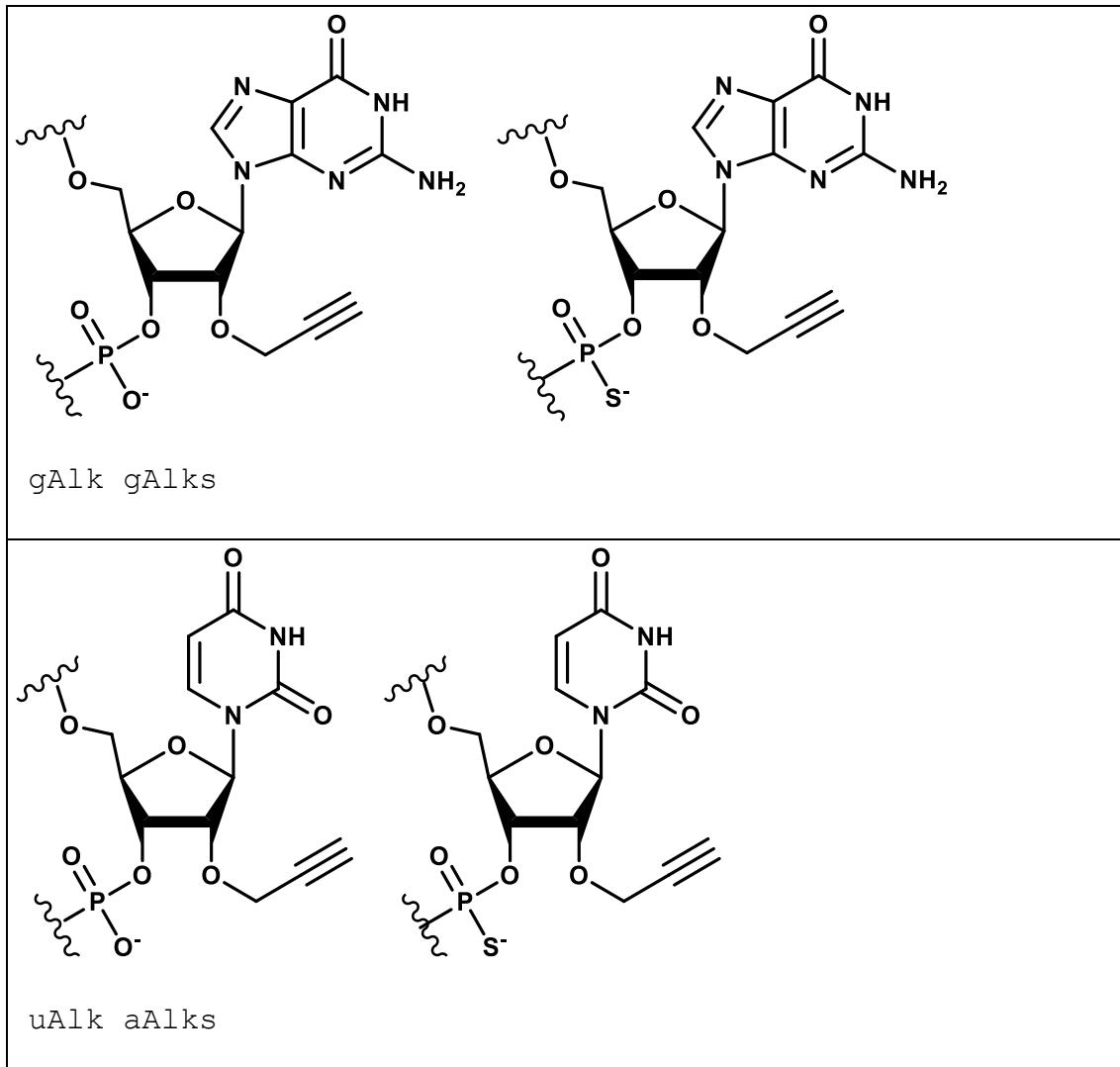
[0232] Em algumas modalidades onde dois ou mais ligantes de direcionamento são conjugados com nucleotídeos internos localizados no filamento de sentido de um agente de RNAi, há um espaço de pelo menos um nucleotídeo que não está conjugado com um ligante de direcionamento posicionado entre os dois nucleotídeos internos que são conjugados para visar ligantes. Em algumas modalidades em que dois ou mais ligantes de direcionamento são conjugados com o filamento de sentido de um agente de RNAi, pelo menos dois nucleotídeos que não são conjugados com um ligante de direcionamento são posicionados entre dois nucleotídeos internos que são conjugados com ligantes de direcionamento.

[0233] Em algumas modalidades, os ligantes de direcionamento são conjugados ao 2°, 4° e 6° nucleotídeos no filamento de sentido como numerados de 3' a 5', começando no nucleotídeo 3' mais distante que forma um par de base com um nucleotídeo no filamento antissentido. Em algumas modalidades, os ligantes de direcionamento são conjugados ao 2°, 4°, 6° e 8° nucleotídeos (3' → 5') do nucleotídeo de terminal 3' no filamento de sentido que forma um par de base com o filamento antissentido.

[0234] São mostrados na Tabela B abaixo exemplos de nucleotídios modificados para fixar ligantes de direcionamento interno:

Tabela B. Estruturas que representam nucleotídios modificados para fixar ligantes de direcionamento.





EXEMPLOS

[0235] Os exemplos a seguir não são limitativos e se destinam a ilustrar certas modalidades aqui divulgadas.

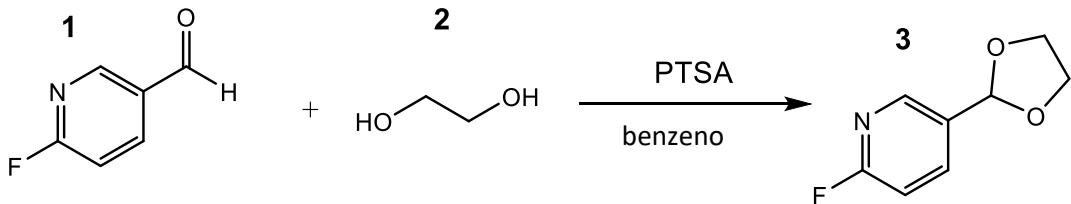
Exemplo 1. Síntese de ligantes dirigidos à integrina.

[0236] Algumas das abreviações usadas nos seguintes detalhes experimentais da síntese dos exemplos são definidas da seguinte forma: h ou hr = hora(s); min = minuto(s); mol = mol(s); mmol = milimol(s); M = molar; M = micromolar; g = grama(s); g = micrograma(s); rt ou RT = temperatura

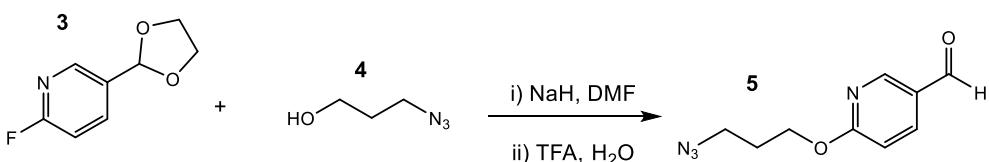
ambiente; L = litro(s); mL = mililitro(s); wt = peso;
 Et₂O = éter dietílico; THF = tetra-hidrofurano;
 DMSO = dimetilsulfóxido; EtOAc = acetato de etilo; Et₃N ou
 TEA = trietilamina; i-Pr₂NET ou DIPEA ou
 DIEA = diisopropiletilamina; CH₂Cl₂ ou DCM = cloreto de
 metileno; CHCl₃ = clorofórmio; CDCl₃ = clorofórmio
 deuterado; CCl₄ = tetracloreto de carbono; MeOH = metanol;
 EtOH = etanol; DMF = dimetilformamida; BOC = t-
 butoxicarbonil; CBZ = benziloxicarbonilo; TBS = t-
 butildimetsilil; TBSCl ou TBDMSCl = cloreto de t-
 butildimetsilil; TFA = ácido trifluoroacético; DMAP = 4-
 dimetilaminopiridina; NaN₃ = azida de sódio; Na₂SO₄ = sulfato
 de sódio; NaHCO₃ = bicarbonato de sódio; NaOH = hidróxido de
 sódio; MgSO₄ = sulfato de magnésio; K₂CO₃ = carbonato de
 potássio; KOH = hidróxido de potássio; NH₄OH = hidróxido de
 amônio; NH₄Cl = cloreto de amônia; SiO₂ = sílica; Pd-
 C = paládio sobre carbono; HCl = cloreto de hidrogênio ou
 ácido clorídrico; NMM = N-metilmorfolina; H₂ = gás
 hidrogênio; KF = fluoreto de potássio; EDC-HCl = cloridrato
 de N-(3-dimetilaminopropil)-N₂-etilcarbodiimida;
 MTBE = éter metil-terc-butílico; MeOH = metanol;
 Ar = argônio; N₂ = nitrogênio; SiO₂ = sílica; R_T = tempo de
 retenção; PTSA = ácido para-toluenossulfônico; PPTS = para-
 toluenossulfonato de piridínio.

**Síntese da estrutura 1c ((S)-3-(6-((1-azida-15-oxo-3,6,9,12-
 tetraoxa-16-azanonadecan-19-il)oxi)piridin-3-il)-3-(2-oxo-**

3-(3-(5,6,7,8-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il) ácido propanoico).

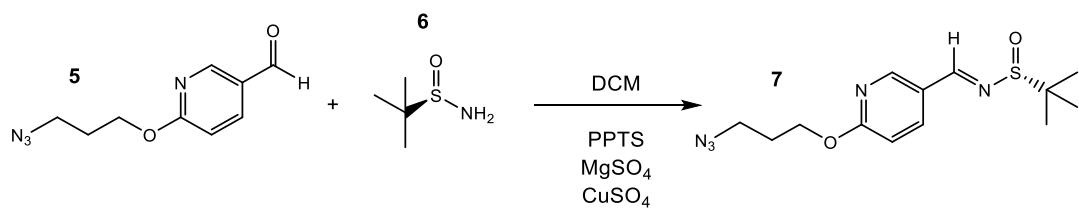


[0237] Uma mistura contendo composto 1 (1,03 g, 8,23 mmol), composto 2 (0,92 g 14,8 mol) e hidrato de PTSA (156 mg, 0,82 mmol) em benzeno (25 mL) foi submetida a refluxo em um aparelho de Dean-Stark durante a noite. Na manhã seguinte, a mistura de reação foi vertida em bicarbonato de sódio saturado e, em seguida, foi adicionado acetato de etilo. A fase orgânica foi separada, filtrada sobre sulfato de sódio e concentrada para obter o composto 3 com 95% de rendimento, que foi usado em seguida sem purificação adicional.

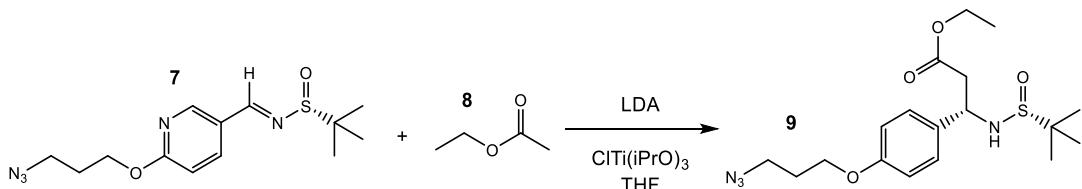


[0238] A uma solução contendo o composto 4 (5,39 g, 53,3 mmol) e peneiras moleculares de 3 Å em DMF (100 mL), foi adicionado hidreto de sódio (60% em peso, 2,13 g, 53,3 mmol) e a reação foi agitada durante 1 hora. Foi adicionada uma solução do composto 3 (7,52 g, 7,52 g) em DMF (20 mL) e a suspensão foi aquecida a 80 °C durante a noite. Após a conclusão, a suspensão foi filtrada sobre um tampão de algodão e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi

dividido entre éter dietílico e água, e a fase orgânica foi separada, filtrada sobre sulfato de sódio e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi tratado com 20 mL de H₂O a 10% em TFA e agitado durante 30 minutos. Após a conclusão, a solução foi resfriada a 0 °C e o pH foi ajustado para 11 com NaOH 6 M; após isto, o produto precipitou-se como um óleo. O composto 5 foi extraído três vezes da suspensão oleosa com éter dietílico. As fases orgânicas foram combinadas, filtradas sobre sulfato de sódio e concentradas. O composto 5 foi então isolado com 26% de rendimento por separação em sílica eluindo um gradiente de acetato de etilo em hexanos.

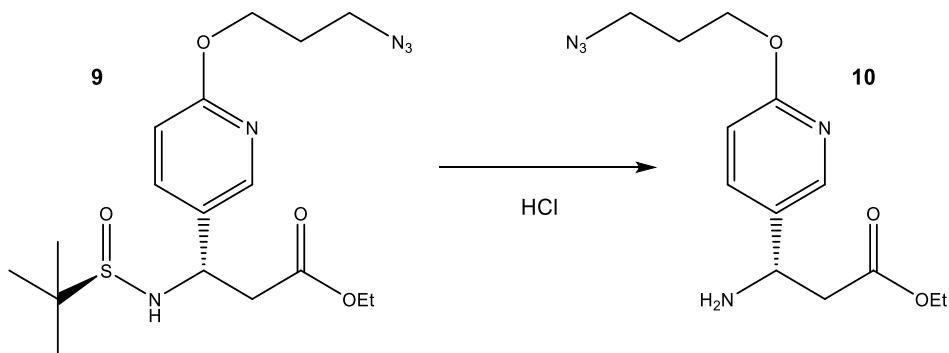


[0239] Uma mistura contendo composto 5 (2,29 g, 9,94 mmol), composto 6 (4,82 g, 39,8 mmol), PPTS (125 mg, 0,50 mmol), sulfato de magnésio (3 g, 24,9 mmol), sulfato de cobre (3,97 g, 24,9 mmol) e peneiras moleculares de 3 angstrom em DCM (22 mL) foi aquecida ao refluxo durante a noite. Após a conclusão, a mistura foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto 7 foi então isolado com rendimento de 76% por separação em sílica, eluindo um gradiente de acetato de etilo em hexanos.

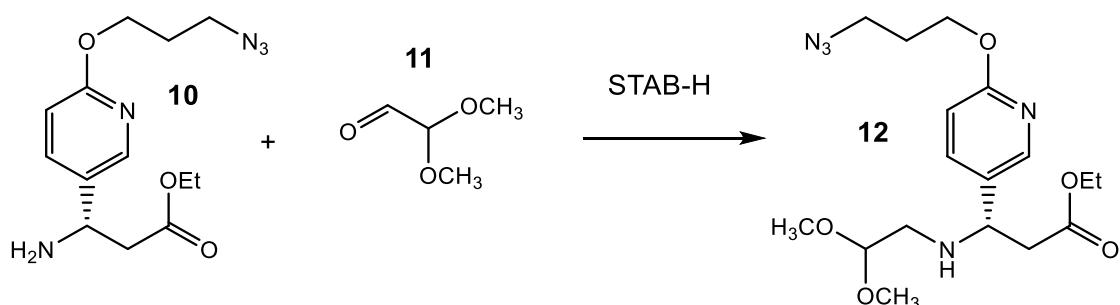


[0240] Um frasco seco por chama foi carregado com THF (40 mL) e diisopropilamina (2,29 g, 22,6 mmol). Foi resfriado a -20 °C e foi adicionado n-BuLi (2,5 M, 8,64 mL, 21,6 mmol) via cânula. A solução foi agitada por 10 minutos a -20 °C, em seguida, resfriada a -78 °C. O composto 8 (2,02 mL, 20,6 mmol) foi adicionado gota a gota com agitação vigorosa. Após a adição, a solução foi agitada por 30 minutos a -78 °C. Em seguida, foi adicionado $\text{ClTi}(\text{iPrO})_3$ (11,26 g, 43,2 mmol) como uma solução em THF (10 mL) via funil de adição durante aproximadamente 10 minutos com agitação vigorosa. A reação foi agitada durante 30 minutos a -78 °C. Finalmente, foi adicionado o composto 7 (2,29 g. 6,86 mmol) gota a gota como uma suspensão em THF e agitado a -78 °C durante 1,25 horas até a reação estar completa. Foi adicionado cloreto de amônia aquoso saturado à reação a -78 °C. A reação foi então removida do resfriamento e deixou-se a fase aquosa descongelar e extinguir gradualmente (a cor amarelo-laranja desaparece). A mistura foi porcionada entre EtOAc e cloreto de amônia aquoso saturado. A fase orgânica foi separada e a fase aquosa foi extraída duas vezes com EtOAc. As fases orgânicas foram combinadas e secas sobre salmoura, depois sobre sulfato de sódio e, em seguida, filtradas e concentradas. O resíduo foi purificado sobre

sílica eluindo com um gradiente de acetato de etilo em hexanos. O composto 9 foi obtido com 75% de rendimento como diastereômero único após purificação.

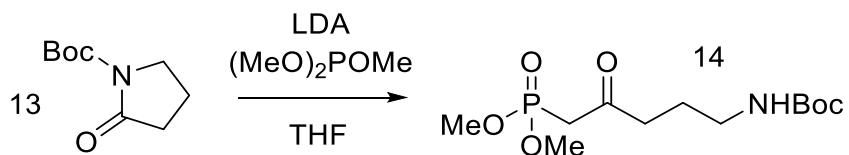


[0241] O composto 9 (1,28 g, 3,21 mmol) em MeOH (3,2 mL) foi tratado com HCl em dioxano (4M, 3,2 mL, 12,9 mmol) e agitado em temperatura ambiente durante 30 minutos. Após a conclusão, a mistura de reação foi diluída com água e lavada com éter dietílico. Posteriormente, o pH foi ajustado para 11 usando NaOH aquoso 2 N e o produto foi extraído com acetato de etila. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio, filtrada e concentrada, rendendo o composto 10 com rendimento de 92%, que foi usado em seguida sem purificação adicional.



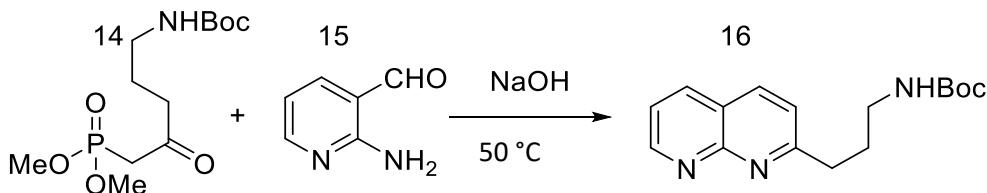
[0242] Foi adicionado à mistura do composto 10 (0,78 g, 2,67 mmol) e composto 11 (0,60 g, 3,46 mmol) em THF (6 mL) a 15 °C STAB-H (1,29 g, 6,12 mmol) em partes como um sólido.

Após a adição, o resfriamento foi removido e a mistura foi agitada durante aproximadamente 2,5 horas até à conclusão. A reação foi extinta pela adição de bicarbonato de sódio aquoso saturado e o pH foi ajustado para 9. O produto foi extraído três vezes com EtOAc; as fases orgânicas foram combinadas, secas com salmoura, filtradas sobre sulfato de sódio em seguida e concentradas. O composto 12 foi isolado com 85% de rendimento por separação em sílica eluindo um gradiente de acetato de etilo em hexanos.



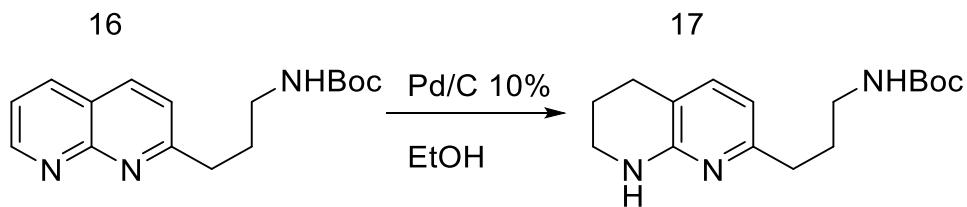
[0243] Foi adicionado à DIPEA (7,53 mL, 53,75 mmol) em THF (35 mL) n-BuLi (2,5 M, 19,9 mL, 49,8 mmol) por meio de uma seringa hermética seca em forno durante 2 minutos a -10 °C. A mistura foi agitada durante 10 minutos a -10 °C, em seguida, resfriada a -60 °C e foi adicionada uma solução de dimetil-metilfosfonato (6,42 g, 51,8 mmol) em THF (8 mL) gota a gota durante 5-10 minutos. Após envelhecimento a -60 °C por cerca de 1 hora, foi adicionado o composto 13 (7,37 g. 39,82 mmol) como solução em THF (15 mL) gota a gota ao longo de 5 minutos a -60 °C. A mistura de reação foi agitada a -60 °C durante 1 hora e depois a -41 °C durante cerca de 1,5 horas. A reação foi extinta pela adição de 2,6 equivalentes de H₂SO₄ (2,0 M) e extraída três vezes com acetato de etila (~ 50 mL). As fases orgânicas foram

combinadas e secas com salmoura, filtradas sobre sulfato de sódio e concentradas brevemente para determinar o peso bruto e tomar uma amostra para NMR. Após a determinação do peso seco, o composto 14 foi dissolvido em MeOH para uso na próxima reação sem purificação adicional. Calculado para ter 75,83% de rendimento. Peso bruto/% de peso 76,3% por NMR. ¹H NMR: 400 MHz CDCl₃ δ 4,75 (s, 1 H), 3,81 (s, 3 H), 3,78 (s, 3 H), 3,10 – 3,14 (m, 2 H), 3,04 – 3,09 (m, 2 H), 2,68 (t, 2 H), 1,82–1,75 (m, 2 H), 1,44 (s, 9 H).

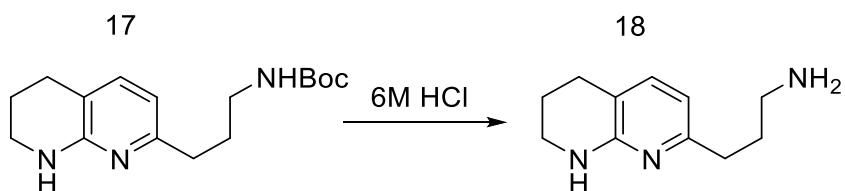


[0244] Foi adicionado ao composto 14 (9,33 g em peso de NMR de ~12 g em bruto, 30,16 mmol) em MeOH (40 mL) uma solução de NaOH (1,45 g, 36,2 mmol) em água (1,5 mL). A mistura foi aquecida a 50 °C e o composto 15 (2,76 g, 6,03 mmol) foi adicionado. Após agitação durante 30 minutos, uma segunda porção do composto 15 (736 mg, 1,45 g, 3,62 mmol) foi adicionada e a mistura de reação foi agitada durante a noite a 50 °C. A mistura de reação foi então concentrada em um óleo e particionada entre 2 volumes de EtOAc e 1 volume de H₂O. A fase orgânica foi separada e lavada com 1 volume de água. As lavagens aquosas foram combinadas e extraídas de volta (2x, 1 vol) com EtOAc. A fase orgânica combinada foi seca sobre sulfato de sódio, filtrada e concentrada. O produto bruto foi seco sobre

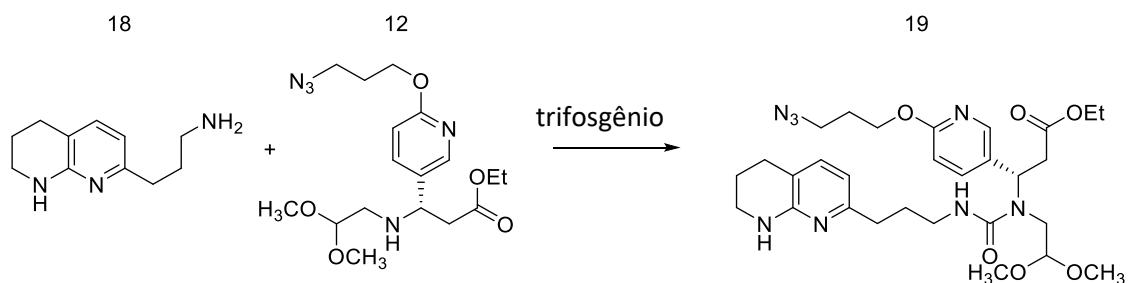
aproximadamente 20 g de sílica, o composto 16 foi isolado com rendimento de 69% por separação em sílica eluindo um gradiente de acetato de etilo em hexanos contendo 1% de trietilamina. **¹H NMR:** 400 MHz CDCl₃ δ 9,09 (dd, 1 H), 8,17 (dd, 1 H), 8,12 (d, 1 H), 7,46 (dd, 1 H), 7,41 (d, 1 H), 4,78 (s, 1 H), 3,24 (q, 2 H), 3,10 (t, 2 H), 2,12 (quin, 2 H), 1,43 (s, 9 H).



[0245] Uma solução do composto 16 (5,98 g, 20,8 mmol) em EtOH (50 mL) foi carregada com paládio (10% em carbono, 2,22 g, 2,08 mmol) e hidrogênio a 1 atmosfera. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Após a conclusão, a mistura de reação foi filtrada sobre Celite® e concentrada. O composto 17 foi isolado com 79% de rendimento por separação em sílica eluindo um gradiente de acetato de etilo em hexanos contendo 1% de trietilamina. **¹H NMR:** 400 MHz CDCl₃ δ 7,05 (d, 1 H), 6,34 (d, 1 H), 5,48 (s, 1 H), 4,81 (s, 1 H), 3,36 - 3,43 (m, 2 H), 3,16 (q, 2 H), 2,68 (t, 2 H), 2,59 (t, 2 H), 1,90 (dt, 2 H), 1,83 (quin, 2 H), 1,44 (s, 9 H).

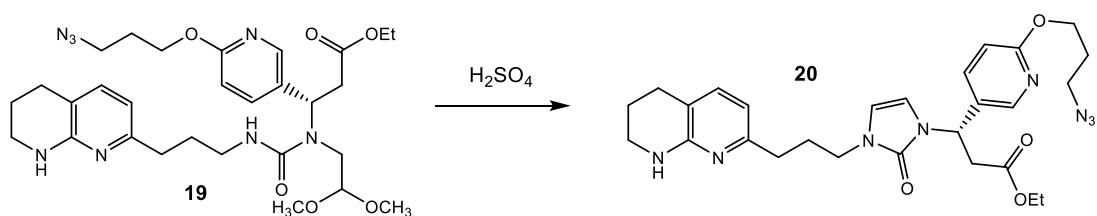


[0246] O composto 17 (4,81 g, 16,53 mmol) foi dissolvido em HCl 6 M aquoso (16,4 mL) e aquecido a 42 °C durante 2 horas. Uma porção adicional de HCl 6 M (2,8 mL) foi então adicionada e a mistura de reação foi agitada por mais 2 horas. À reação foi adicionado cloreto de sódio seguido por 2 N NaOH aquoso até o produto precipitar como um óleo (o pH foi maior do que 12). A mistura foi extraída três vezes com 2-butanol. A fase orgânica combinada foi seca sobre sulfato de sódio, filtrada e concentrada. O composto 18 foi obtido com 85% de rendimento e usado em seguida sem purificação adicional. **¹H NMR:** 400 MHz CDCl₃ δ 7,06 (d, 1 H), 6,35 (d, 1 H), 4,83 (s, 1 H), 3,35 - 3,46 (m, 2 H), 2,75-2,67 (m, 4 H), 2,58 (t, 2 H), 1,88 - 1,95 (m, 2 H), 1,84-1,76 (m, 4 H).

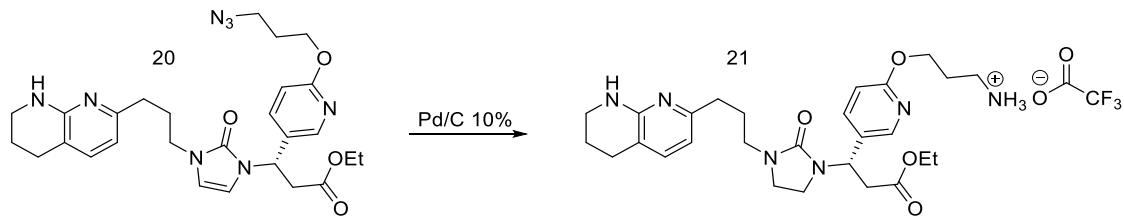


[0247] Foi adicionadogota a gota uma solução do composto 18 (236 mg, 0,62 mmol) e TEA (0,134 mL, 0,96 mmol) em THF (0,5 mL) a uma solução de trifosgênio (85 mg, 0,28 mmol) em THF (0,9 mL) em um frasco seco por chama a -10 °C. A mistura de reação foi aquecida em temperatura ambiente. Depois que a TLC indicou uma reação completa, foi adicionado TEA adicional (0,134 mL), sequido pela adição do composto 12

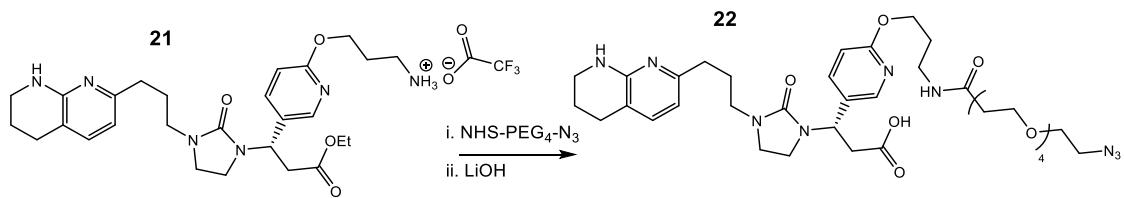
(166 mg, 0,87 mmol) como um sólido. A mistura heterogênea foi aquecida a 50 °C por 2 horas com agitação vigorosa. Após a conclusão, a mistura de reação foi extinta com 1 volume de água e extraída três vezes com EtOAc. A fase orgânica combinada foi seca com salmoura, filtrada sobre sulfato de sódio e concentrada. O composto 19 foi obtido supondo um rendimento de 100% e utilizado em seguida sem purificação adicional.



[0248] Foi adicionado H_2SO_4 (2M, 0,6 mL) ao composto bruto 19 (400 mg, 0,62 mmol assumido) dissolvido em THF (37 mL) e a mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Na manhã seguinte, uma porção adicional de H_2SO_4 (0,65 equivalentes) foi adicionada. Quatro horas depois, a reação estava completa. A mistura de reação foi diluída com acetato de etilo. A fase orgânica foi separada e a fase aquosa foi extraída de novo uma vez com acetato de etilo. A fase orgânica combinada foi filtrada sobre sulfato de sódio e concentrada. O composto 20 foi isolado com 75% de rendimento por separação sobre sílica eluindo um gradiente de MeOH em DCM.



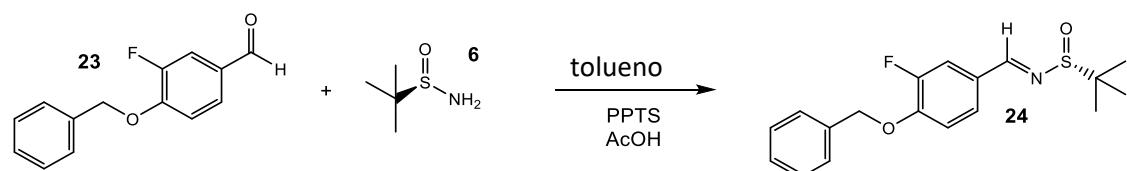
[0249] Foi carregado H₂ em uma suspensão do composto 20 (251 mg, 0,47 mmol) e Pd/C (10% em peso, 100 mg, 0,094 mmol) em etanol (9 mL) a 1 atmosfera e agitado a 35 °C durante a noite. Após a conclusão, o paládio foi removido por filtração sobre Celite®. O Composto 21 foi isolado com 20% de rendimento como sal de TFA por HPLC de fase reversa usando uma coluna C₁₈ 5 μ 19x250 mm BEH (Waters Corp.) eluindo um gradiente de acetonitrila em H₂O contendo 1% de TFA.



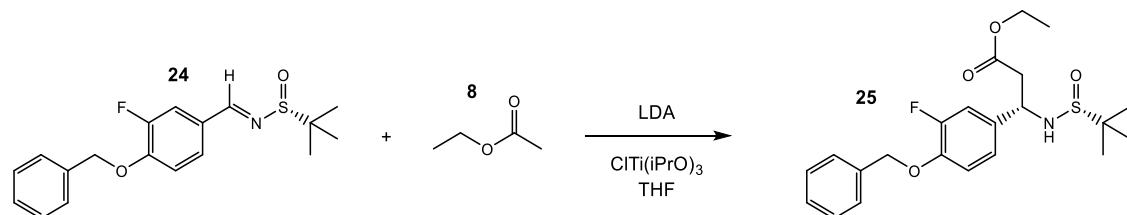
[0250] A uma solução do composto 21 (61 mg, 0,097 mmol) em DCM (250uL) foi adicionado TEA (8 uL, 0,24 mmol) seguido pela adição de NHS-PEG₄-N₃ (41,4 mg, 0,11 mmol) como uma solução em DCM (275 µL). A mistura de reação foi agitada por 15 minutos e verificada em LC-MS, que mostrou que a reação estava completa. Todos os voláteis foram removidos e o resíduo foi dissolvido em EtOH (0,4 mL) e água (0,4 mL). Foi adicionado LiOH (11,2 mg, 0,47 mmol) e a mistura de reação foi aquecida a 40 °C durante 2 horas. Após a conclusão, a mistura de reação foi concentrada sob pressão reduzida. O composto 22 (Estrutura 1c) foi isolado com 42% de rendimento.

por HPLC de fase reversa usando uma coluna C₁₈ 5μ 19x250 mm BEH (Waters Corp.) eluindo um gradiente de acetonitrila em H₂O contendo 1% de TFA.

Síntese da estrutura 2c ((S)-3-(4-(2-(2-(2-(azidoetoxi)etoxi)etoxi)etoxi)-3-fluorofenil)-3-(2-oxo-3-(3-(5,6,7,8-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il) ácido propanoico).

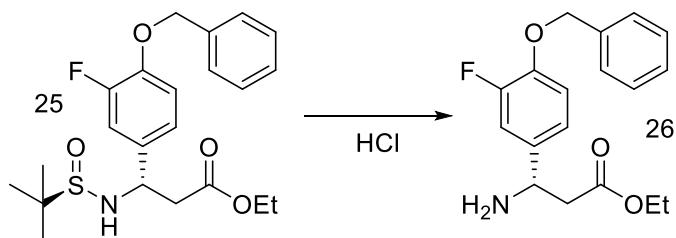


[0251] O composto 6 (21,1 g, 0,17 mol), PPTS (0,55 g, 2,2 mmol) e, em seguida, ácido acético (1,24 mL, 21,7 mmol)) foi adicionado a uma solução do composto 23 (10 g, 43,4 mmol) em tolueno (80 mL). O vaso de reação foi equipado com um aparelho Dean-Stark e depois aquecido ao refluxo durante a noite. Após a conclusão, a mistura de reação foi concentrada e seca em 60 gramas de sílica e purificada sobre SiO₂ com um gradiente de acetato de etila em hexanos, rendendo o composto 24 em 66% de rendimento. **¹H NMR:** 400 MHz CDCl₃ δ 8,47 (s, 1 H), 7,68 (d, 1 H), 7,31 – 7,56 (m, 6 H), 6,98 – 7,16 (m, 1 H), 5,23 (s, 2 H), 1,26 (s, 9 H).

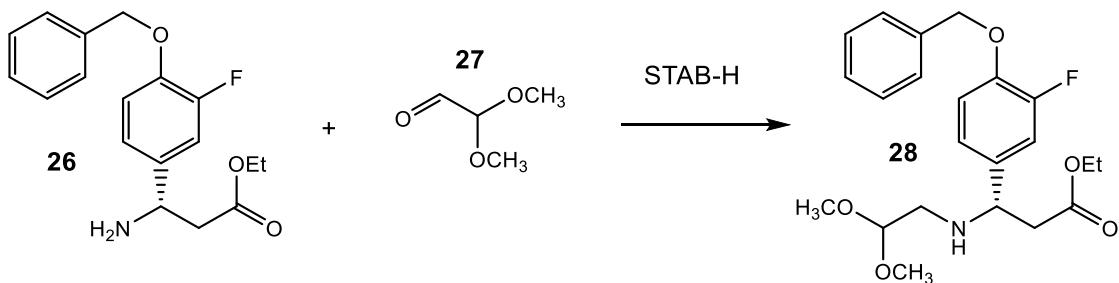


[0252] Um frasco seco por chama foi carregado com THF (190 mL) e DIPEA (9,07 g, 89,7 mmol), resfriado a -20 °C e, em seguida, carregado com n-BuLi (2,5 M, 34,2 mL, 85,6 mmol) por meio de cânula. A solução foi agitada por 10 minutos a -20 °C, em seguida, resfriada a -78 °C. O composto 8 (8 mL, 81,5 mmol) foi adicionado gota a gota com agitação vigorosa. Após a adição, agitado por 30 min a -78 °C. Em seguida, foi adicionado ClTi(iPrO)₃ (44,6 g, 0,171 mol) como solução em THF (40 mL) via funil de adição ao longo de 10 minutos. A reação foi agitada durante 30 minutos a -78 °C. Finalmente, o composto 24 (9,06 g, 27,2 mmol) foi adicionado gota a gota como uma suspensão em THF (20 mL) e agitado a -78 °C durante 1,25 hora até a reação estar completa. Foi adicionado cloreto de amônia aquoso saturado à reação a -78 °C. A reação foi então removida do resfriamento e deixou-se a fase aquosa descongelar e extinguir gradualmente (a cor amarelo-laranja desaparece). A mistura foi particionada entre EtOAc e cloreto de amônia aquoso saturado. A fase orgânica foi separada e a aquosa foi lavada duas vezes com EtOAc. As fases orgânicas foram combinadas e secas sobre salmoura, em seguida sobre sulfato de sódio, filtradas e concentradas. O composto 25 foi obtido com 70% de rendimento como um único diastereômero por separação em sílica eluindo um gradiente de acetato de etila em hexanos. **¹H NMR:** 400 MHz CDCl₃ δ 7,31 – 7,48 (m, 5 H), 7,09 (dd, 1 H), 6,89 – 7,04 (m, 2 H), 5,13 (s, 2 H), 4,59 –

4,76 (m, 2 H), 4,13 (q, 2 H), 2,81 (dd, 2 H), 1,21 - 1,25 (m, 12 H).

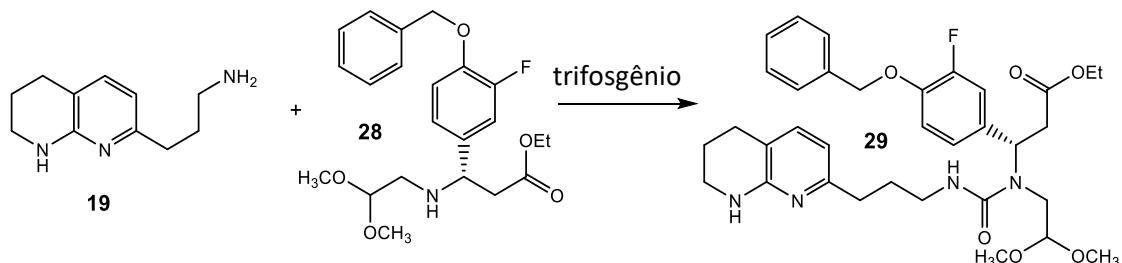


[0253] Foi adicionado HCl aquoso (6M, 20,7 mL, 0,124 mol) seguido por MeOH (60 mL) ao composto 25 (8,07 g, 19,1 mmol). THF foi adicionado até a solução homogênea ser obtida, e a mistura de reação foi agitada durante 6 horas em temperatura ambiente. A mistura de reação foi basificada a pH 10 com NaOH 2 N aquoso e depois foi extraída três vezes com EtOAc. As fases orgânicas combinadas foram secas com salmoura, filtradas sobre sulfato de sódio e concentradas. O composto 26 foi obtido com rendimento de 95% e foi usado em seguida sem purificação adicional. **¹H NMR:** 400 MHz CDCl₃ δ 7,28 - 7,46 (m, 6 H), 7,18 (d, 1 H), 6,99 (t, 1 H), 5,11 (s, 2 H), 4,57 (t, 1 H), 4,09 (q, 2 H), 2,97 - 3,09 (m, 1 H), 2,81 - 2,93 (m, 1 H), 1,18 (t, 3 H).



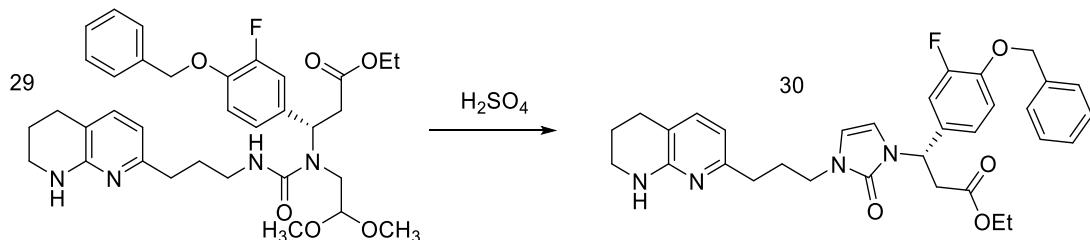
[0254] Foi adicionado STAB-H (8,85 g, 41,8 mmol) em partes como um sólido a uma mistura do composto 26 (5,76 g, 18,2 mmol) e do composto 27 (4,09 g, 23,6 mmol) em THF

(40 mL) a 0 °C. Após a adição final, o resfriamento foi removido e a mistura foi agitada durante aproximadamente 2,5 horas até à conclusão. A mistura de reação foi extinta pela adição de bicarbonato de sódio aquoso saturado. A mistura foi extraída três vezes com EtOAc. As fases orgânicas combinadas foram secas com salmoura, filtradas sobre sulfato de sódio e concentradas. O composto 28 foi isolado com 73% de rendimento por separação em sílica eluindo um gradiente de acetato de etilo em hexanos. **¹H NMR:** 400 MHz CDCl₃ δ 7,30 – 7,49 (m, 5 H), 7,11 (dd, 1 H), 6,88 – 7,02 (m, 2 H), 5,13 (s, 2 H), 4,40 (t, 1 H), 4,10 (q, 2 H), 4,00 (dd, 1 H), 3,35 (s, 3 H), 3,31 (s, 3 H), 2,47 – 2,75 (m, 4 H), 1,20 (t, 3 H).

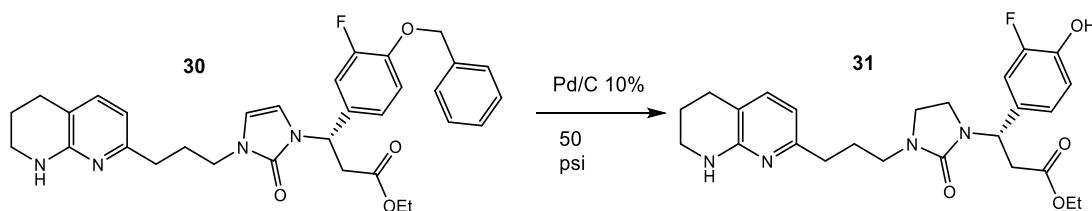


[0255] Foi adicionada gota a gota uma solução do composto 19 (3,64 g, 8,99 mmol) e TEA (1,94 mmol, 13,9 mmol) em THF (6 mL) a uma solução de trifosgênio (1,2 g, 4,04 mmol) em THF (24 mL) em frasco seco por chama a -10 °C. A mistura de reação foi aquecida em temperatura ambiente. Depois que a TLC indicou uma reação completa, foi adicionado TEA adicional (3,3 mL, 23,6 mmol) seguido pela adição de composto 28 (2,61 g, 13,7 mmol) como um sólido. A mistura heterogênea foi aquecida a 50 °C por 2 horas com agitação vigorosa. Após a conclusão, a mistura de reação foi extinta com 1 volume de

água e extraída três vezes com EtOAc. A fase orgânica combinada foi seca com salmoura, filtrada sobre sulfato de sódio e concentrada. O composto 29 foi obtido presumindo um rendimento de 100% e o produto bruto foi usado em seguida sem purificação adicional.



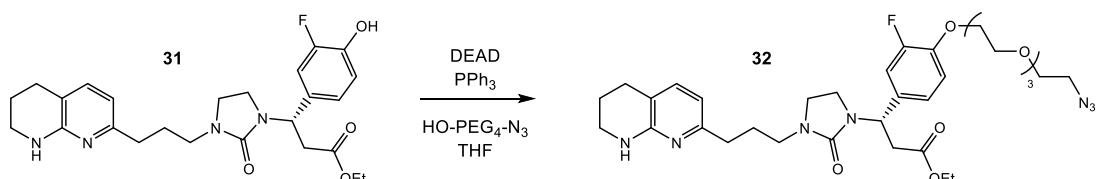
[0256] Foi adicionada água (0,8 mL) e H₂SO₄ (2M, 8,07 mL, 16,2 mmol) ao composto 29 (5,59 g, 8,97 mmol) dissolvido em THF (37 mL) e a mistura de reação foi agitada a 28 °C durante a noite. Na manhã seguinte, o pH da mistura foi ajustado para 9 usando bicarbonato de sódio e extraído três vezes com DCM. As fases orgânicas combinadas foram secas com salmoura, filtradas sobre sulfato de sódio e concentradas. O composto 30 foi isolado com rendimento de 82% por separação em sílica eluindo um gradiente de MeOH em DCM contendo 1% de TEA.



[0257] Ao composto 30 (4,13 g, 7,39 mmol) dissolvido em EtOH (30 mL) foi carregado paládio Degussa® (10% em peso, 3,15 g, 2,96 mmol) e hidrogênio a 50 psi. A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. No dia

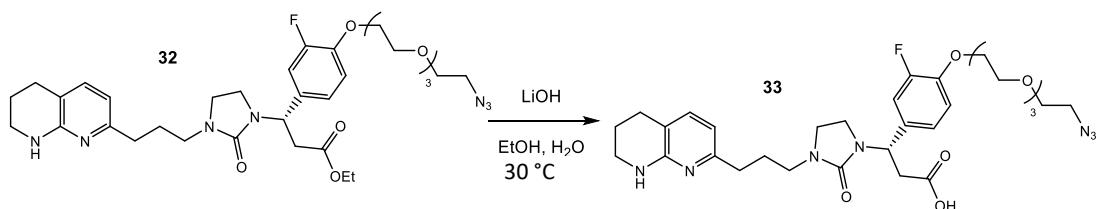
seguinte, a reação estava 64% concluída. A mistura de reação foi filtrada sobre Celite® e concentrada. O resíduo foi dissolvido em EtOH e carregado com paládio (10% em peso, 1,57 g, 1,48 mmol) e hidrogênio a 50 psi. Após agitação por 48 horas, a mistura de reação foi aquecida a 30 °C e agitada por mais 24 horas. Após a conclusão, a suspensão foi filtrada sobre Celite® e todos os voláteis foram removidos in vacuo. O resíduo foi purificado sobre sílica eluindo um gradiente de MeOH em DCM, rendendo o composto 31 com 72% de rendimento.

¹H NMR: 400 MHz DMSO-d₆ δ 9,88 (s, 1 H), 7,02 – 7,14 (m, 2 H), 6,86 – 6,93 (m, 2 H), 6,50 – 6,76 (m, 1 H), 6,31 (d, 1 H), 5,17 (t, 1 H), 4,00 (q, 2 H), 3,23 – 3,28 (m, 4 H), 2,79 – 3,18 (m, 7 H), 2,61 (t, 2 H), 2,41 (t, 2 H), 1,65 – 1,78 (m, 4 H), 1,09 (t, 3 H).



[0258] Foi adicionado gota a gota uma solução de DEAD a uma solução de PPh₃ (699 mg, 2,66 mmol) em THF (0,47 mL) a - 10 °C. A mistura foi aquecida em temperatura ambiente e adicionada a uma mistura pura do composto 31 (600 mg, 1,33 mmol) e HO-PEG₄-N₃, (466 mg, 3,06 mmol) e agitada durante a noite. A mistura de reação foi então concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado sobre sílica eluindo um gradiente de MeOH em DCM, rendendo o composto 32 em 50% de rendimento. **¹H NMR:** 400 MHz DMSO-d₆ δ 7,10 – 7,19

(m, 2 H), 6,97 – 7,06 (m, 2 H), 6,18 – 6,31 (m, 2 H), 5,20 (t, 1 H), 4,13 – 4,16 (m, 1 H), 3,98 – 4,04 (m, 2 H), 3,71 – 3,80 (m, 2 H), 3,52 – 3,61 (m, 8 H), 3,38 – 3,37 (m, 5 H), 3,10 – 3,25 (m, 5 H), 2,79 – 3,08 (m, 5 H), 2,59 (t, 2 H), 2,31 – 2,42 (m, 2 H), 1,65 – 1,75 (m, 4 H), 1,10 (t, 3 H).

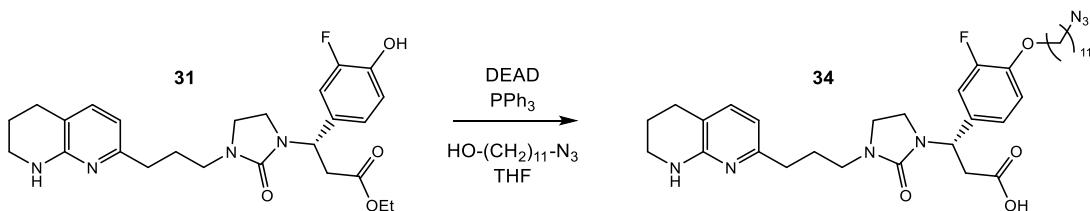


[0259] Foi adicionado EtOH (3 mL) e H₂O (3 mL), seguido por LiOH (97 mg, 4,05 mmol) ao composto 32 (826 mg, 1,23 mmol). A mistura foi agitada a 30 °C durante a noite. Após a conclusão, a mistura foi neutralizada a pH=5 usando HCl aquoso 6 M e concentrada. O resíduo foi purificado por HPLC de fase reversa com uma coluna Phenomenex Gemini C18, 50 x 250 mm, de 10 µm, eluindo um gradiente de acetonitrila em água contendo 0,1%, rendendo o composto 33 (Estrutura 2c) com 81% de rendimento. **¹H NMR:** 400 MHz D₂O δ 7,30 (d, 1 H), 7,01 – 7,19 (m, 3 H), 6,45 (d, 1 H), 5,24 (t, 1 H), 4,14 – 4,32 (m, 2 H), 3,84 – 3,92 (m, 2 H), 3,59 – 3,77 (m, 10 H), 3,14 – 3,45 (m, 8 H), 0,02 – 3,12 (m, 1 H), 2,97 (d, 2 H), 2,85 (q, 1 H), 2,50 – 2,72 (m, 4 H), 1,68 – 1,94 (m, 4 H).

Síntese da estrutura 2.1c ((S)-3-(4-((11-azidoundecil)oxi)-3-fluorofenil)-3-(2-oxo-3-(3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il)propanoico).

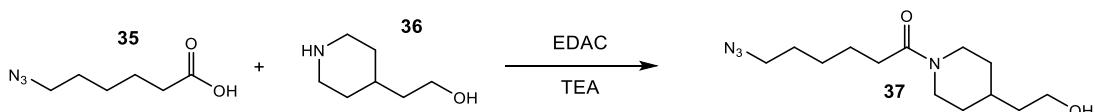
tetrahidro-1,8-

ácido



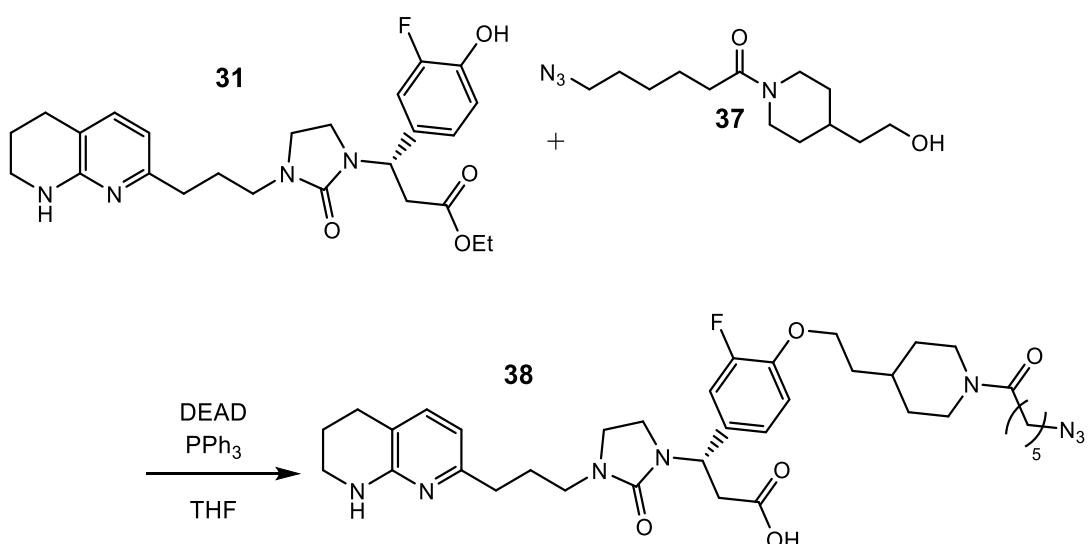
[0260] Foi adicionado gota a gota uma solução de DEAD em temperatura ambiente a uma solução de PPh_3 em THF. A mistura foi transferida para um frasco contendo a mistura do composto 31 e $\text{OH}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{N}_3$, e a mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Os voláteis foram removidos da mistura de reação e o produto bruto foi dissolvido em EtOH. LiOH foi adicionado como uma solução em H_2O , e mais água/EtOH foi adicionado até a mistura de reação se tornar homogênea. Após agitação em temperatura ambiente durante 1,5 hora, a mistura foi acidificada para um pH de 3 com H_2SO_4 , concentrada e purificada por HPLC de fase reversa (Phenomenex Gemini C18, 50 x 250 mm, 10 μm , 0,1% de TFA em acetonitrila/água, eluição gradiente).

Síntese da estrutura 2.2c *((S)-3-(4-(2-(1-(6-azidohexanoil)piperidin-4-il)etoxi)-3-fluorofenil)-3-(2-oxo-3-(3-(5,6,7,8-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il) ácido propanoico).*



[0261] O composto 35 dissolvido em DCM a 0 °C foi tratado com EDAC e foi adicionado acetonitrila para ajudar na solubilidade. Após 5 minutos, TEA e o composto 36 foram

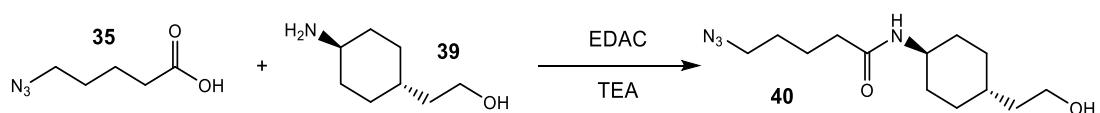
adicionados, o resfriamento foi removido e a agitação continuou durante 2 horas. Após a conclusão, foi adicionado cloreto de amônia saturado e a fase orgânica foi separada, filtrada sobre sulfato de sódio e concentrada. O produto bruto obtido foi utilizado em seguida sem purificação adicional.



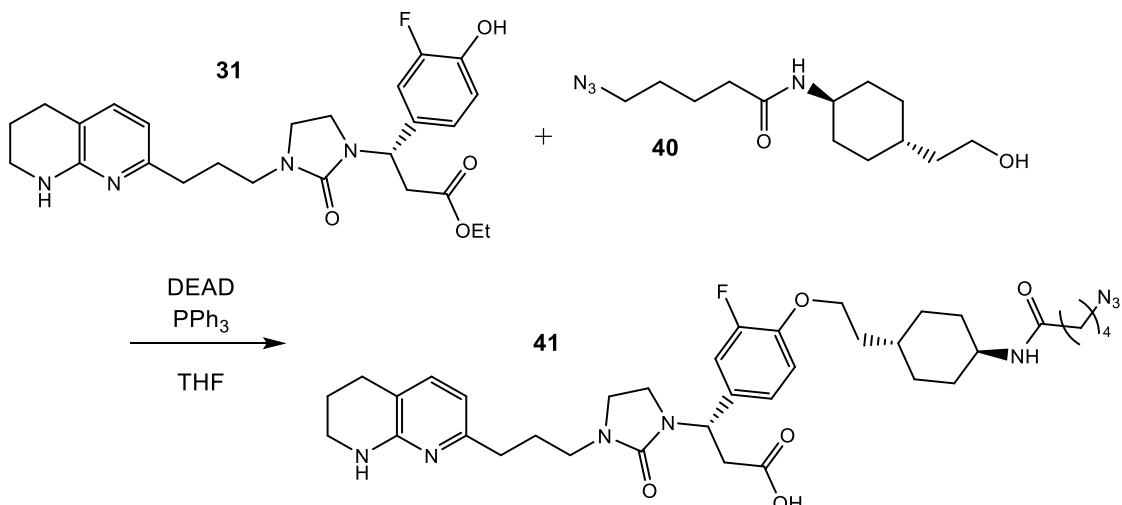
[0262] Foi adicionado gota a gota uma solução de DEAD em temperatura ambiente a uma solução de PPh₃ em THF com agitação vigorosa. A mistura foi transferida para um frasco contendo uma mistura do composto 31 e do composto 37, e a mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Os voláteis foram removidos da mistura de reação e o produto bruto foi dissolvido em EtOH. Foi adicionado LiOH como uma solução em H₂O, e água adicional foi adicionada até a mistura de reação se tornar homogênea. Após agitação em temperatura ambiente durante 1,5 hora, a mistura foi acidificada para um pH de 3 com H₂SO₄, concentrada e purificada por HPLC de fase reversa (Phenomenex Gemini C18,

50 x 250 mm, 10 µm, 0,1% de TFA em acetonitrila/água, eluição gradiente), resultando no composto 38 (Estrutura 2.2c).

Síntese da estrutura 2.3c ((S)-3-(4-(2-((1r, 4s)-4-(5-azidopentanamido)ciclohexil)etoxi)-3-fluorofenil)-3-oxo-3-(3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il) ácido propanoico).



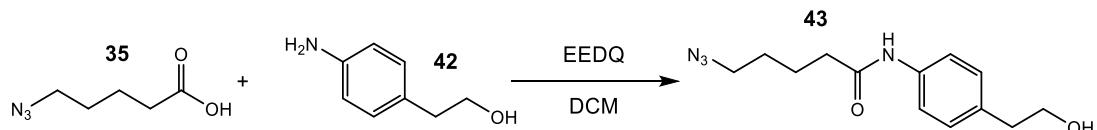
[0263] Foi adicionado EDAC à suspensão do composto 35 em DCM a 0 °C como uma solução em DCM. Após 5 minutos, o resfriamento foi removido e o composto 39 foi adicionado, seguido pela adição de TEA. A mistura heterogênea foi agitada durante a noite em temperatura ambiente. No dia seguinte, a reação foi diluída com DCM e o precipitado dissolvido. A mistura foi lavada duas vezes com 5% KHSO₄ e uma vez com salmoura. A fase orgânica foi filtrada sobre sulfato de sódio e concentrada. O resíduo bruto contendo o composto 40 foi usado sem purificação adicional.



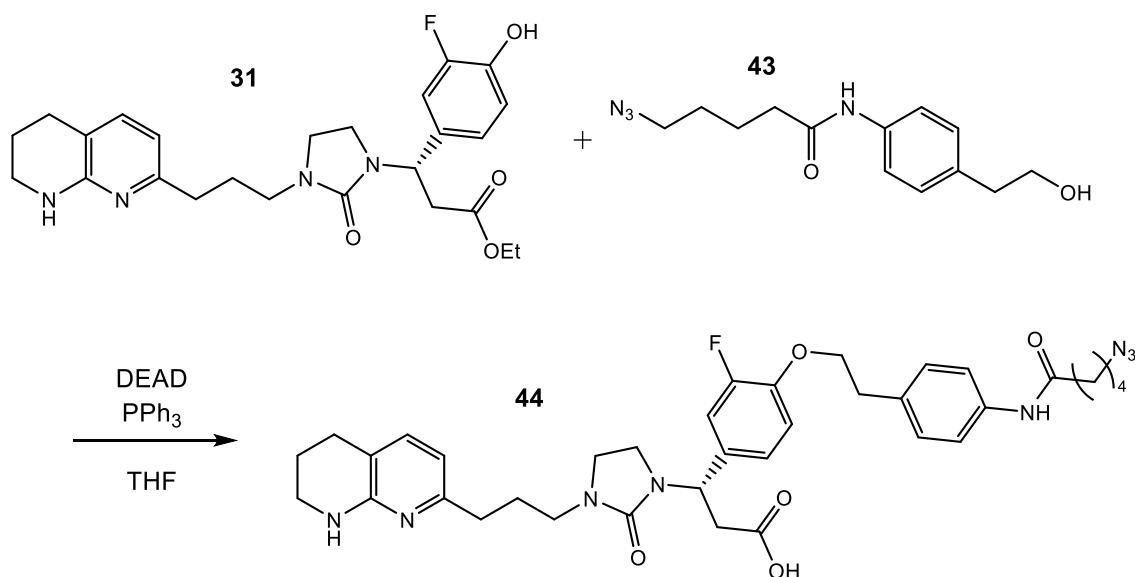
[0264] Foi adicionado gota a gota uma solução de DEAD em temperatura ambiente a uma solução de PPh₃ em THF com agitação vigorosa. A mistura foi transferida para um frasco contendo uma mistura do composto 31 e do composto 40, e a mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Os voláteis foram removidos da mistura de reação e o produto bruto foi dissolvido em EtoH. Foi adicionado LiOH como uma solução em H₂O, e água adicional foi adicionada até a mistura de reação se tornar homogênea. Após agitação em temperatura ambiente durante 1,5 hora, a mistura foi acidificada para um pH de 3 com H₂SO₄, concentrada e purificada por HPLC de fase reversa (Phenomenex Gemini C18, 50 x 250 mm, 10 µm, 0,1% de TFA em acetonitrila/água, eluição gradiente), resultando no composto 41 (Estrutura 2.3c).

Síntese da estrutura 2.4c ((S)-3-(4-(4-azidopentanamido)fenetoxi)-3-fluorofenil)-3-(2-oxo-3-(3-

(5,6,7,8-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il) ácido propanoico).



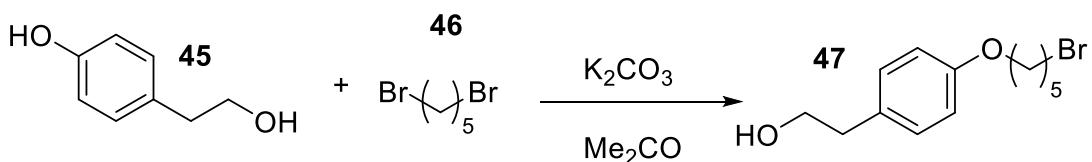
[0265] Foi adicionado EEDQ a uma mistura do composto 35 e do composto 42 em DCM e a solução foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. A mistura de reação foi então diluída com DCM, lavada três vezes com HCl 1M e lavada uma vez com salmoura. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio, filtrada e concentrada. O composto 43 foi então usado sem purificação adicional.



[0266] Foi adicionado gota a gota uma solução de DEAD em temperatura ambiente a uma solução de PPh_3 em THF com agitação vigorosa. A mistura foi transferida para um frasco contendo uma mistura do composto 31 e do composto 43, e a mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Os voláteis foram removidos da mistura de reação e

o produto bruto foi dissolvido em EtOH. Foi adicionado LiOH como uma solução em H₂O, e água adicional foi adicionada até a mistura de reação se tornar homogênea. Após agitação em temperatura ambiente durante 1,5 hora, a mistura foi acidificada para um pH de 3 com H₂SO₄, concentrada e purificada por HPLC de fase reversa (Phenomenex Gemini C18, 50 x 250 mm, 10 µm, 0,1% de TFA em acetonitrila/água, eluição gradiente), resultando no composto 44 (Estrutura 2.4c).

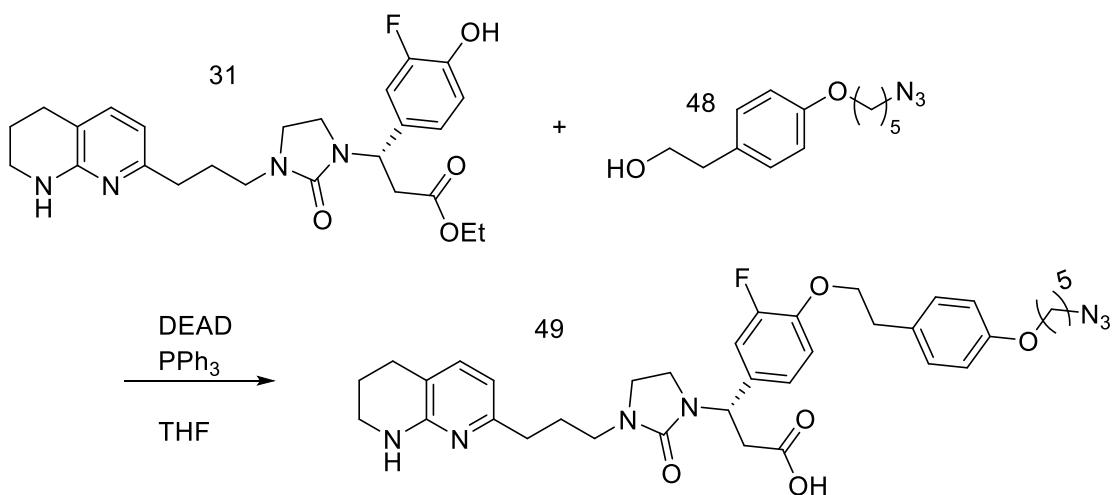
Síntese da estrutura 2.5c ((S)-3-(4-(4-((5-azidopentil)oxi)fenetoxi)-3-fluorofenil)-3-(2-oxo-3-(3-(5,6,7,8-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il) ácido propanoico).



[0267] Foi adicionado carbonato de potássio a uma solução do composto 45 e do composto 46 em acetona. A mistura foi aquecida a 65 °C em um frasco selado como uma suspensão com agitação vigorosa durante a noite sob proteção de N₂. A reação foi então filtrada, concentrada e purificada sobre sílica eluindo um gradiente de acetato de etil em hexanos, produzindo o composto 47.



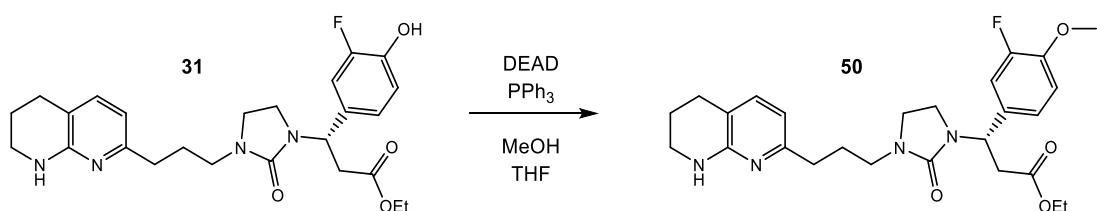
[0268] Foi adicionado azida de sódio a uma solução do composto 47 em DMF e a mistura foi agitada a 80 °C em um frasco selado sob proteção de nitrogênio durante a noite. Após a conclusão, foi adicionado 1 volume de água e o produto foi extraído com acetato de etilo. A fase orgânica separada foi filtrada sobre sulfato de sódio e concentrada. O composto 48 em bruto foi utilizado sem purificação adicional.



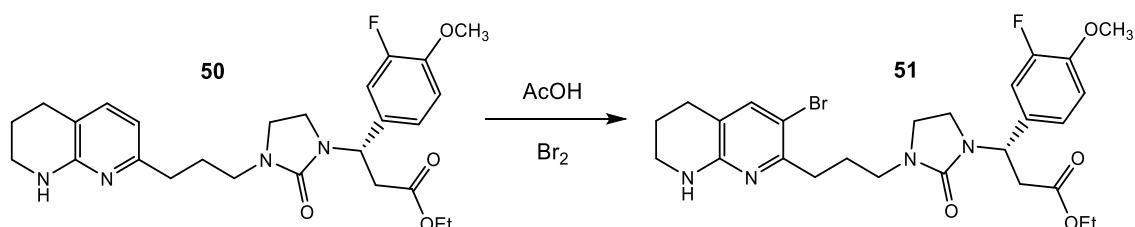
[0269] Foi adicionado gota a gota uma solução de DEAD em temperatura ambiente a uma solução de PPh_3 em THF com agitação vigorosa. A mistura foi transferida para um frasco contendo uma mistura do composto 31 e do composto 48, e a mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Os voláteis foram removidos da mistura de reação e o produto bruto foi dissolvido em EtOH. Foi adicionado LiOH como uma solução em H_2O , e água adicional foi adicionada até a mistura de reação se tornar homogênea. Após agitação em temperatura ambiente durante 1,5 hora, a mistura foi acidificada para um pH de 3 com H_2SO_4 , concentrada e

purificada por HPLC de fase reversa (Phenomenex Gemini C18, 50 x 250 mm, 10 µm, 0,1% de TFA em acetonitrila/água, eluição gradiente), resultando no composto 49 (Estrutura 2.5c).

Síntese da estrutura 2.6c ((S)-3-(3-(3-(3-(17-azida-3-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-2-azaheptadecil)-5,6,7,8-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)-2-oxoimidazolidin-1-il)-3-(3-fluoro-4-metoxifenil) ácido propanoico).

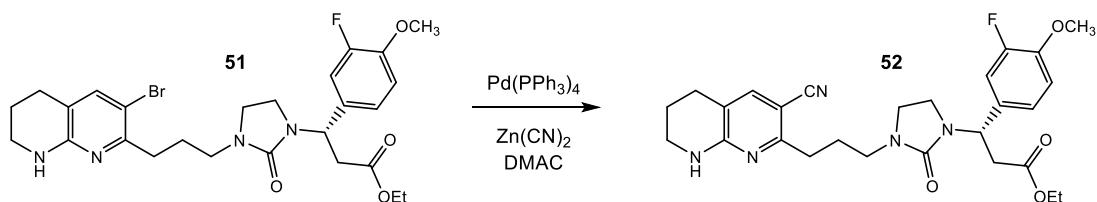


[0270] Foi adicionado gota a gota uma solução de DEAD a 0 °C a uma solução de PPh₃ em THF. Após adição completa, a mistura foi transferida para um frasco contendo uma mistura pura do composto 31 e MeOH. O frasco foi tampado com N₂ e agitado em temperatura ambiente durante a noite. Após a conclusão, todos os voláteis foram removidos e o produto bruto obtido foi purificado sobre sílica eluindo um gradiente de MeOH em DCM, produzindo o composto 50.

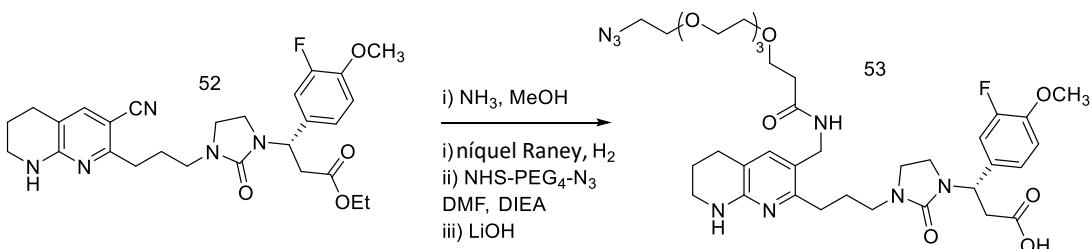


[0271] Foi adicionado bromo a uma solução do composto 50 em AcOH e a mistura foi agitada durante 0,5 hora. Após a conclusão, a reação foi diluída com 5 volumes de acetato de

etila e 2,5 volumes de água. A camada aquosa foi neutralizada a pH 7 com bicarbonato de sódio aquoso saturado e a fase orgânica foi separada. A camada aquosa foi extraída mais duas vezes com acetato de etilo. As fases orgânicas combinadas foram secas sobre sulfato de sódio, filtradas e concentradas. O produto bruto obtido do composto 51 foi utilizado em seguida sem purificação adicional.



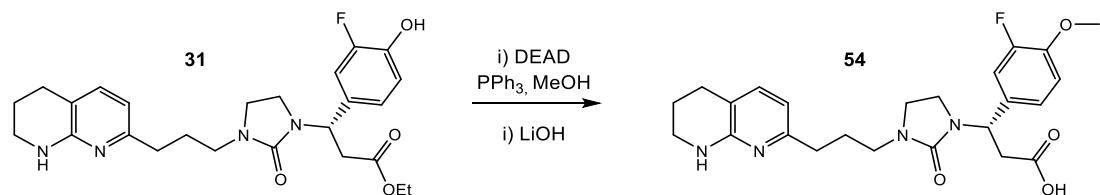
[0272] Uma solução do composto 51, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ e $\text{Zn}(\text{CN})_2$ em DMAC foi desgaseificada com nitrogênio por 30 minutos. A mistura foi aquecida a 128 °C em um frasco selado durante a noite. Após a conclusão, a mistura foi diluída com 5 volumes de EtOAc. A fase orgânica foi separada e depois lavada duas vezes com água, lavada duas vezes com salmoura e, em seguida, a fase orgânica foi filtrada sobre sulfato de sódio e concentrada. O resíduo foi purificado sobre sílica eluindo 100% de EtOAc, resultando no composto 52.



[0273] A uma solução do composto 52 em MeOH foi adicionado amônia, em seguida uma pasta de níquel Raney que foi pré-lavada três vezes com metanol. Um frasco Parr® foi carregado

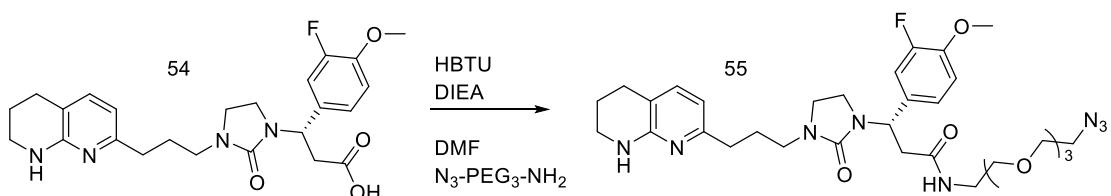
a 60 psi com hidrogênio e agitado em temperatura ambiente durante 16 horas. Após a conclusão, a suspensão foi filtrada e concentrada. O resíduo bruto obtido foi redissolvido em DMF. DIEA e NHS-PEG₄-N₃ foram adicionados e a mistura foi agitada durante uma hora. Após a conclusão, todos os voláteis foram removidos e o resíduo bruto foi redissolvido em uma mistura de MeOH e THF. Foi adicionado LiOH em H₂O e a mistura foi agitada em temperatura ambiente durante 17 horas. Após a conclusão da reação, o pH foi ajustado para 3 com TFA e a mistura foi diretamente injetada em HPLC de fase reversa semipreparativa (Phenomenex Gemini C18, 250 x 21,2 mm, 5 µm, 0,1% de TFA em água/ACN, eluição de gradiente), produzindo o composto 53 (Estrutura 2.6c).

Síntese da estrutura 2.7c ((S)-N-(2-(2-(2-(azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-3-(3-fluoro-4-metoxifenil)-3-(2-oxo-3-(3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il) propanamida), estrutura 2.8c, estrutura 2.9c e estrutura 2.10 c.



[0274] Foi adicionado em sequência THF, PPh₃ e uma solução de DEAD gota a gota a 0 °C ao composto 31. A mistura foi agitada durante 16 horas em temperatura ambiente. A mistura foi então resfriada a -20 °C durante 1 hora e filtrada para remover o óxido de trifenilfosfina. O filtrado foi

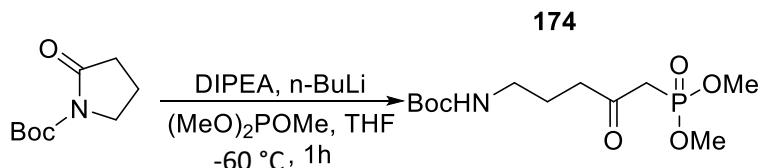
concentrado e o intermediário da O-alquilação isolado por purificação em sílica, eluindo um gradiente de acetato de etilo em hexanos contendo 1% de TEA. O intermediário isolado foi então suspenso em uma mistura de THF e H₂O, tratado com LiOH em H₂O e agitado a 35 °C por 16 horas. Após a conclusão, o pH foi ajustado para 7 com HCl 2 M e todos os voláteis foram removidos. O produto bruto foi suspenso em H₂O; foi adicionado cloreto de sódio e o composto 54 foi extraído com acetato de etilo cinco vezes. As fases orgânicas foram combinadas, filtradas sobre sulfato de sódio e concentradas. O composto 54 foi usado em seguida sem purificação adicional.



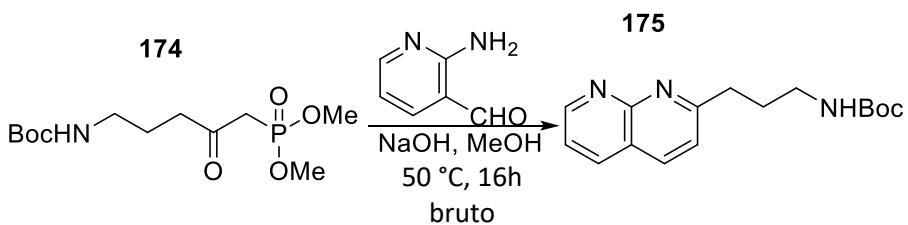
[0275] Uma solução do composto 54 em DMF foi tratada com HBTU e agitada durante 5 minutos. DIEA e N₃-PEG₃-NH₂ foram adicionados em seguida e a mistura foi agitada em temperatura ambiente durante 16 horas. Após a conclusão, o pH foi ajustado para 3 com TFA e o composto 55 foi isolado por injeção direta em HPLC de fase reversa semipreparativa (Phenomenex Gemini C18, 250 x 21,2 mm, 5 µm, 0,1% de TFA em água/ACN, eluição de gradiente), rendendo o composto 55.

[0276] Foram usados procedimentos semelhantes para sintetizar os compostos 2.8c, 2.9c e 2.10c, usando N₃-PEG₁₁-NH₂, N₃-PEG₂₃-NH₂ e N₃-PEG₃₅-NH₂, respectivamente.

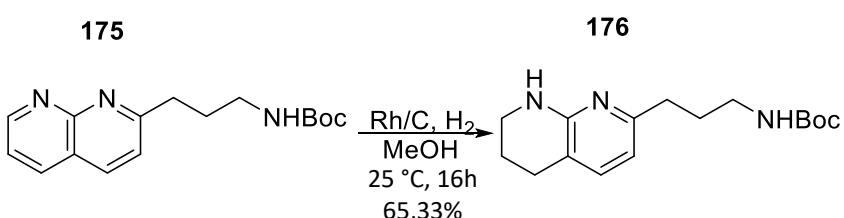
Síntese da estrutura 2.11c ((R)-3-(4-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etoxi)-3-fluorofenil)-3-(2-oxo-3-(3-(5,6,7,8-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-il)propil)imidazolidin-1-il) ácido propanoico).



[0277] Em um frasco de fundo redondo de 4 gargalos de 3 L purgado e mantido com uma atmosfera inerte de nitrogênio, foi colocado THF (1,50 L), DIPEA (150,00 mL, 716.000 mmol, 0,88 equiv.), N-BuLi (430,00 mL, 680.000 mmol, 0,84 equiv.) Seguiu-se a adição de fosfito de trimetila (195,00 mL) a -60 °C e agitado durante 1h a -60 °C. A isto foi adicionado 2-oxopirrolidina-1-carboxilato de terc-butila (150,00 g, 809,835 mmol, 1,00 equiv.) a -60 °C. A solução resultante foi agitada por 1h a -60 °C em um banho de nitrogênio líquido. A reação foi então extinta pela adição de 350 mL de H₂SO₄ (2N) e diluída com 1,5 L de H₂O. A solução resultante foi extraída com 2x1 L de acetato de etilo. A mistura resultante foi lavada com 1x1 L de H₂O, seca sobre sulfato de sódio anidro e concentrada sob vácuo. Isto resultou em 200 g (bruto) de terc-butil N-[5-(dimetoxifosforil)-4-oxopentil]carbamato como óleo amarelo.

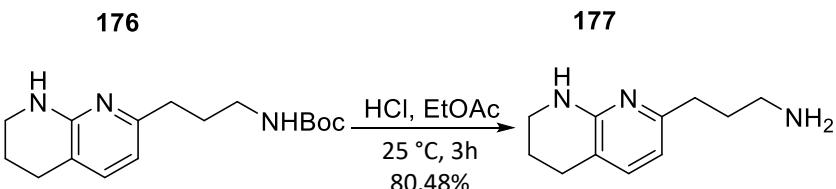


[0278] Em um frasco de fundo redondo de 3 L, foi colocado terc-butil N-[5-(dimetoxifosforil)-4-oxopentil]carbamato (200,00 g, 1500,00 mmol, 1,50 equiv.), MeOH (1,50 L), 2-aminopiridina-3-carbaldeído (53,00 g, 1000,00 mmol, 1,00 equiv.), NaOH (50,00 g, 1500,00 mmol, 1,50 equiv.). A solução resultante foi agitada por 16 h a 50 °C em um banho de óleo. O valor de pH da solução foi ajustado para 8 com NaHCO₃ (aq.). A mistura resultante foi concentrada. A reação foi então extinta pela adição de 1,5 L de água e extraída com 2x1.5 L de acetato de etila. As camadas orgânicas combinadas foram secas sobre sulfato de sódio anidro e concentradas sob vácuo. Isto resultou em 160 g (bruto) de terc-butil N-[3-(1,8-naftiridin-2-il)propil]carbamato como óleo amarelo.

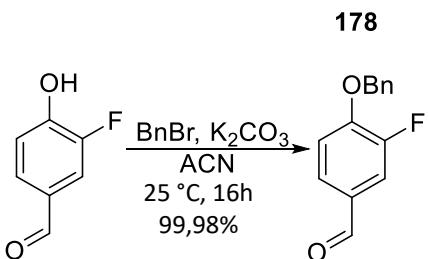


[0279] Em um balão de fundo redondo de 5 L, foi colocado terc-butil N-[3-(1,8-naftiridin-2-il)propil]carbamato (160,00 g, 556,787 mmol, 1,00 equiv.), MeOH (2,00 L), Rh/C (140,00 g, 1,360 mmol), H₂ (40 Psi). A solução resultante foi agitada por 16 h a 25 °C. Os sólidos foram filtrados. A

mistura resultante foi concentrada. Isto resultou em 106 g (65,33%) de terc-butil N-[3-(5,6,7,8-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-il)propil]carbamato como um sólido amarelo.

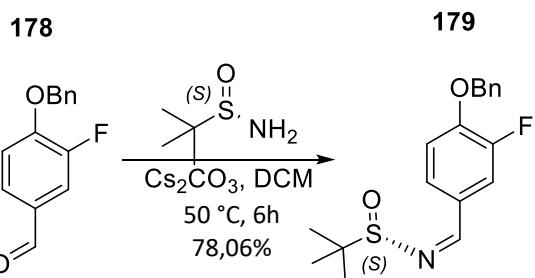


[0280] Em um balão de fundo redondo de 1 L, foi colocado terc-butil N-[3-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil]carbamato (106,00 g, 363,767 mmol, 1,00 equiv.), EtOAc (500,00 mL), HCl em EtOAc (4M, 400,00 mL). A solução resultante foi agitada por 3 h a 25 °C. A solução resultante foi diluída com 1 L de H₂O. NaOH (aq.) foi empregado para ajustar o pH para 11. A solução resultante foi extraída com 2x1 L de acetato de etilo. As camadas orgânicas combinadas foram secas sobre sulfato de sódio anidro e concentradas sob vácuo. Isto resultou em 56 g (80,48%) de 3-(5,6,7,8-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-il)propan-1-amina como um sólido amarelo.

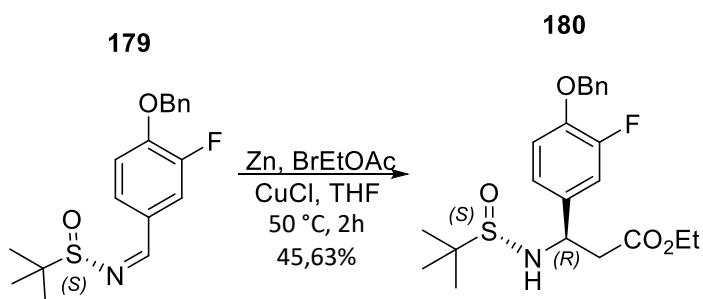


[0281] Em um balão de fundo redondo de 2 L, foi colocado 3-fluoro-4-hidroxibenzoaldeído (140,00 g, 999,194 mmol, 1,00 equiv.), ACN (1000 mL), (bromometil) benzeno (205,08 g,

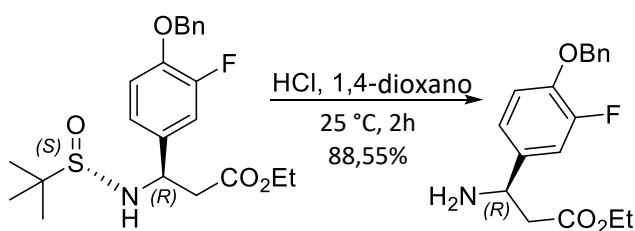
1199,039 mmol, 1,20 equiv.), K_2CO_3 (414,28 g, 2997,581 mmol, 3,00 equiv.). A solução resultante foi agitada por 16 h a 25 °C. Os sólidos foram filtrados. A mistura resultante foi concentrada. Isto resultou em 230 g (99,98%) de 4-(benziloxi)-3-fluorobenzaldeído como um sólido branco.



[0282] Em um frasco de fundo redondo de 3 L, foi colocado 4-(benziloxi)-3-fluorobenzaldeído (230,00 g, 998,966 mmol, 1,00 equiv.), DCM (1600 mL), (S)-2-metilpropano-2-sulfinamida (145,29 g, 1198,762 mmol, 1,20 equiv.), Cs_2CO_3 (650,97 g, 1997,933 mmol, 2,00 equiv.). A solução resultante foi agitada por 6 h a 50 °C em um banho de óleo. Os sólidos foram filtrados. A mistura resultante foi concentrada. Isto resultou em 260 g (78,06%) de (S)-N-[4-(benziloxi)-3-fluorofenil]methylideno]-2-metilpropano-2-sulfinamida como um sólido branco.

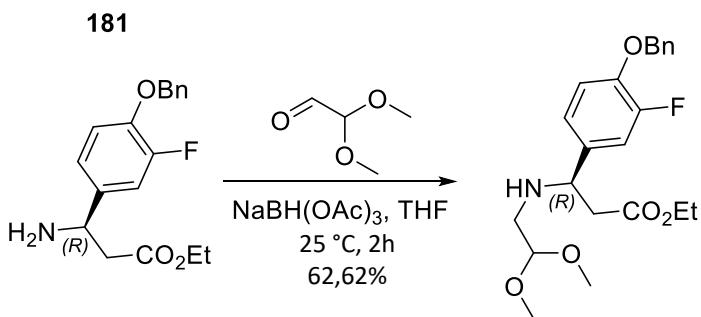


[0283] Em um frasco de fundo redondo de 3 L purgado e mantido com uma atmosfera inerte de nitrogênio, foi colocado THF (2,0 L), Zn (1,02 kg, 15595,945 mmol, 20,00 equiv.), CuCl (115,80 g, 1169,696 mmol, 1,50 equiv.), 2-bromoacetato de etil (325,57 g, 1949,498 mmol, 2,50 equiv.), (S)-N-[[4-(benziloxi)-3-fluorofenil]metilideno]-2-metilpropano-2-sulfinamida (260,00 g , 779,797 mmol, 1,00 equiv.). A solução resultante foi agitada por 30 minutos a 0 °C em um banho de água/gelo. A solução resultante foi deixada reagir, com agitação, por mais 2 h enquanto a temperatura era mantida a 50 °C em um banho de óleo. Os sólidos foram filtrados. A mistura resultante foi concentrada. A reação foi então extinta pela adição de 2 L de água e extraída com 2x2 L de acetato de etila. As camadas orgânicas combinadas foram secas sobre sulfato de sódio anidro e concentradas sob vácuo. Isto resultou em 150 g (45,63%) de (3R)-3-[4-(benziloxi)-3-fluorofenil]-3-[(S)-2-metilpropano-2-sulfinil]amino]propanoato de etila como amarelo óleo.

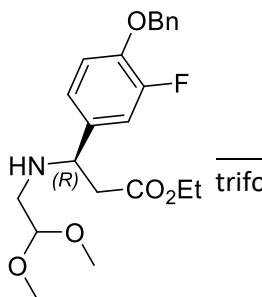
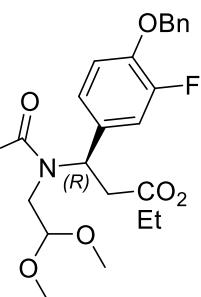
180**181**

[0284] Em um balão de fundo redondo de 1 L, foi colocado (3R)-3-[4-(benziloxi)-3-fluorofenil]-3-[(S)-2-metilpropano-2-sulfinil]amino]propanoato de etila

(150,00 g, 355,847 mmol, 1,00 equiv.), HCl em 1,4-dioxano (400,00 mL, 4M). A solução resultante foi agitada por 2 h a 25 °C. A mistura resultante foi concentrada. A reação foi então extinta pela adição de 1 L de água. Foi empregado NaHCO₃ (aq.) para ajustar o pH para 8. A solução resultante foi extraída com 2x1 L de acetato de etila, seca sobre sulfato de sódio anidro e concentrada. Isto resultou em 100 g (88,55%) de (3R)-3-amino-3-[4-(benziloxi)-3-fluorofenil]propanoato de etila como um óleo amarelo.

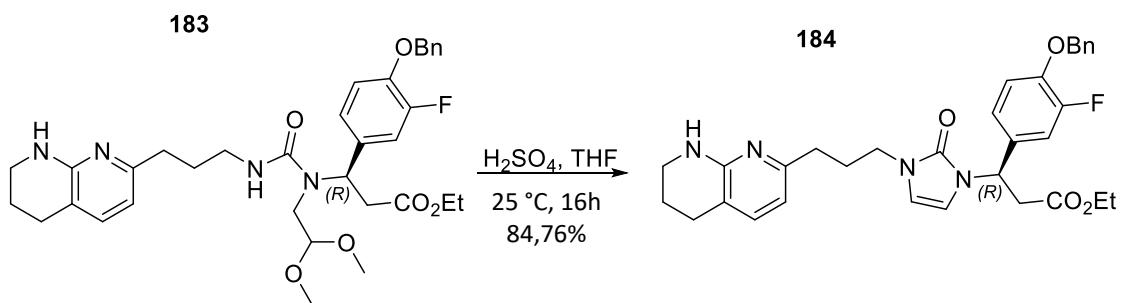
182

[0285] Em um balão de fundo redondo de 2 L, foi colocado (3R)-3-amino-3-[4-(benziloxi)-3-fluorofenil]propanoato de etil (100,00 g, 315,100 mmol, 1,00 equiv.), THF (1,00 L), 2,2-dimetoxiacetaldeído (49,21 g, 472,696 mmol, 1,50 equiv.), NaBH(OAc)₃ (133,57 g, 630,199 mmol, 2,00 equiv.). A solução resultante foi agitada por 2 h a 25 °C. A reação foi então extinta pela adição de 1 L de água. A solução resultante foi extraída com 2x1 L de acetato de etila seca sobre Na₂SO₄ e concentrada sob vácuo. Isto resultou em 80 g (62,62%) de (3R)-3-[4-(benziloxi)-3-fluorofenil]-3-[(2,2-dimetoxietil)amino]propanoato de etila como um óleo amarelo.

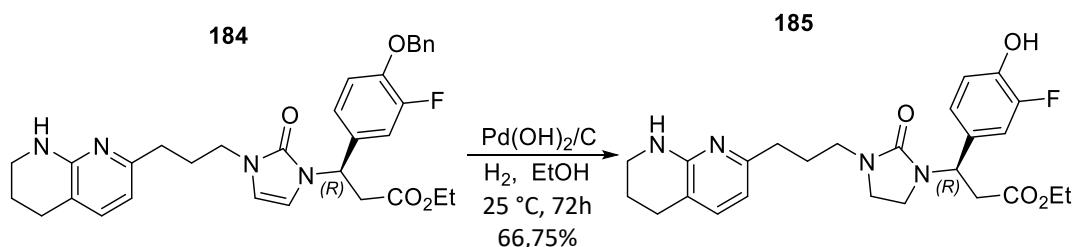
182**183**

177
trifosgênio , TEA
THF
50 °C, 1h
78,13%

[0286] Em um balão de fundo redondo de 3 gargalos de 2 L, foi colocado trifosgênio (22,25 g, 74,975 mmol, 0,38 equiv.), THF (500 mL), etil (3R)-3-[4-(benziloxi)-3-fluorofenil]-3-[(2,2-dimetoxietil)amino]propanoato (80,00 g, 197,304 mmol, 1,00 equiv.), TEA (29,95 g, 295,956 mmol, 1,50 equiv.), 3- (5,6,7,8-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-il)propan-1-amina (Composto 177, 33,97 g, 177,573 mmol, 0,90 equiv.). A solução resultante foi agitada por 1 h a 50 °C em um banho de óleo. A reação foi então extinta pela adição de 1 L de água. Foi empregado NaHCO₃ (aq.) para ajustar o pH para 8. A solução resultante foi extraída com 2x1 L de acetato de etila, seca sobre sulfato de sódio anidro e concentrada. Isso resultou em 96 g (78,13%) de etil (3R)-3-[4-(benziloxi)-3-fluorofenil]-3-[(2,2-dimetoxietil) ([3- (5,6,7,8-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-il)propil]carbamoil)]amino]propanoato como óleo em bruto amarelo.



[0287] Em um frasco de fundo redondo de 1000 mL, foi colocado etil (3R)-3-[4-(benziloxi)-3-fluorofenil]-3-[(2,2-dimetoxietil)([3-(5,6,7,8-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-il)propil]carbamoil])amino]propanoato (96,00 g, 154,158 mmol, 1,00 equiv.), THF (500,00 mL), H₂SO₄ (180,00 mL, 2M). A solução resultante foi agitada por 16 h a 25 °C. Foi empregado NaOH (5 M) para ajustar o pH para 8. A solução resultante foi extraída com 2 x 1 L de diclorometano, seco sobre sulfato de sódio anidro e concentrado. O resíduo foi aplicado a uma coluna de sílica gel com diclorometano/metanol (50/1). As frações recolhidas foram combinadas e concentradas. Isto resultou em 73 g (84,76%) de (3R)-3-[4-(benziloxi)-3-fluorofenil]-3-[2-oxo-3-[3-(5,6,7,8-)tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil]-2,3-dihidro-1H-imidazol-1-il]propanoato como óleo amarelo.



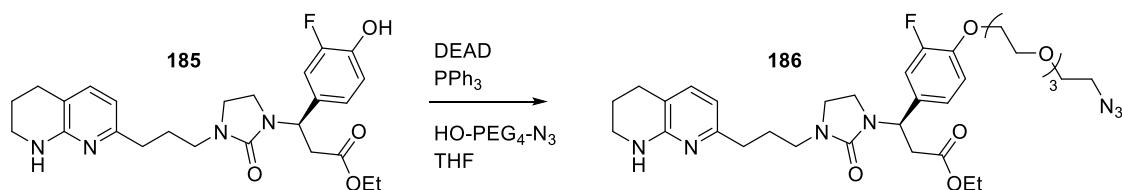
[0288] Em um frasco de fundo redondo de 3 L, foi colocado (3R)-3-[4-(benziloxi)-3-fluorofenil]-3-[2-oxo-3-[3-

(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)propil]-2,3-dihidro-1H-imidazol-1-il]propanoato (73,00 g, 130,671 mmol, 1,00 equiv.), EtOH (1,50 L), Pd(OH)₂/C (60,00 g, 427,259 mmol, 3,27 equiv.), H₂ (50 atm). A solução resultante foi agitada por 72 h a 25 °C. Os sólidos foram filtrados. O resíduo foi aplicado a uma coluna de sílica gel com diclorometano/metanol (9/1). As frações recolhidas foram combinadas e concentradas. Isto resultou em 41,0415 g (66,75%) de (3R)-3-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-3-[2-oxo-3-[3-(5,6,7,8-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-il)propil]imidazolidin-1-il]propanoato como um óleo amarelo.

[0289] LCMS-PH-ARP-052-0: [MS+1]⁺=471

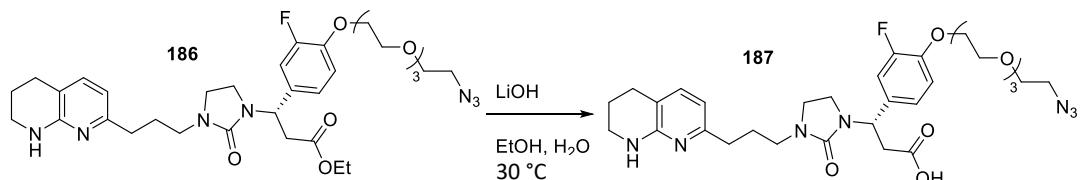
[0290] Rotação óptica $[\alpha]_{D}^{20,0} = +37,5^\circ$ (C = 1 g/100 mL em MeOH)

H-NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 9,84 (s, 1H), 7,07 – 7,00 (m, 2H), 6,95 – 6,850 (m, 2H), 6,24 (d, 2H), 5,18 (t, 1H), 4,06 – 3,96 (m, 2H), 3,32 – 2,75 (m, 10H), 2,60 (t, 2H), 2,37 (t, 2H), 1,77 – 1,67 (m, 4H), 1,10 (t, 3H).



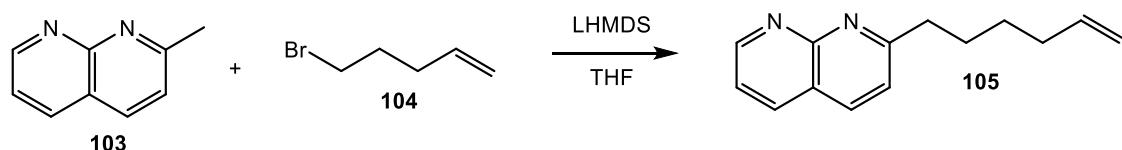
[0291] A uma solução de PPh₃ em THF a -10 °C foi adicionada gota a gota uma solução de DEAD. A mistura foi aquecida em temperatura ambiente e adicionada a uma mistura pura do composto 185 e HO-PEG₄-N₃ e agitada durante a noite. A mistura de reação foi então concentrada sob pressão

reduzida e o resíduo foi purificado sobre sílica eluindo um gradiente de MeOH em DCM, rendendo o composto 186.



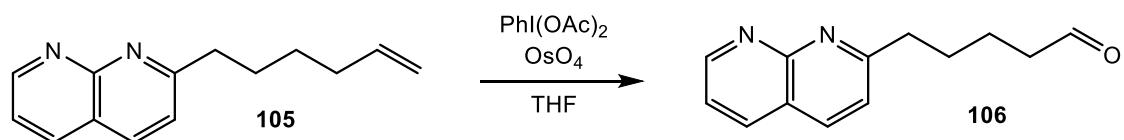
[0292] Ao composto 186 foi adicionado EtOH e H₂O, seguido por LiOH. A mistura foi agitada a 30 °C durante a noite. Após a conclusão, a mistura foi neutralizada a pH=5 usando HCl aquoso 6 M e concentrada. O resíduo foi purificado por HPLC de fase reversa com uma coluna Phenomenex Gemini C18, 50 x 250 mm, 10 µm, eluindo um gradiente de acetonitrila em água contendo 0,1% e rendendo o composto 187 (Estrutura 2.11c).

Síntese da estrutura 28c (composto 118a), estrutura 29c (composto 118b), estrutura 31c (composto 119a) e estrutura 30c (composto 119b).

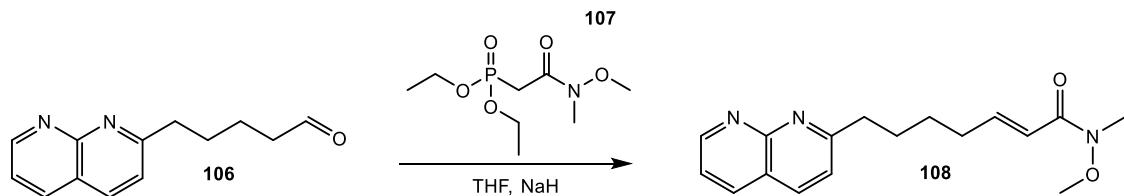


[0293] Foi adicionado a uma solução de LHMDS (1,0 M em THF, 95 mL, 95 mmol) e THF (60 mL) uma solução do composto 103 (2-metil-[1,8]naftiridina (12,5 g, 86,7 mmol)) em THF (180 mL) gota a gota a -78 °C. Após agitação durante 30 minutos, uma solução do composto 104 (5-bromo-1-penteno (19,4 g, 130 mmol)) em THF (120 mL) foi adicionada à mistura

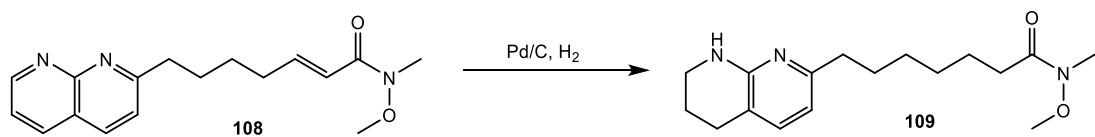
de reaçãogota a gota. A mistura de reação foi aquecida a 0 °C e agitada durante 4 horas. A mistura de reação foi extinta com solução aquosa saturada de NH₄Cl (100 mL) e água deionizada (100 mL), em seguida extraída com acetato de etil (2 x 400 mL). A fase orgânica combinada foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada, concentrada e o composto 105 foi isolado por CombiFlash® eluindo um gradiente de 50-100% de acetato de etil em hexanos. Rendimento do composto 105: 7,93 g (43%).



[0294] A uma solução do composto 105 (2,50 g, 11,8 mmol) em acetona (67,5 mL), água (7,5 mL) e 2,6 lutidina (2,74 mL, 23,6 mmol) foi adicionado N-óxido de 4-metilmorfolina (2,07 g, 17,7 mmol) e tetróxido de ósmio (2,5% em peso em t-butanol, 2,40 g, 0,24 mmol) em temperatura ambiente. Após agitação durante 75 minutos, (diacetoxiido) benzeno (5,69 g, 17,7 mmol) foi adicionado à mistura de reação. A mistura de reação foi agitada durante 2 horas e então extinta com solução aquosa saturada de tiossulfato de sódio (100 mL) e extraída com acetato de etila (2 x 100 mL). A fase orgânica combinada foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada, concentrada e o composto 106 foi isolado por CombiFlash® eluindo um gradiente de 0-5% de metanol em acetato de etila. Rendimento do composto 106: 1,12 g (44%).

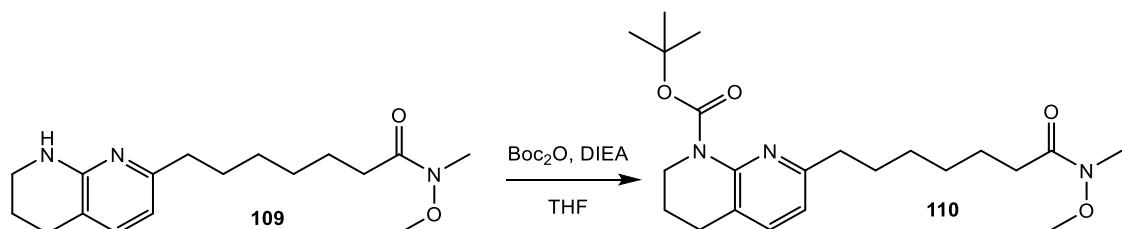


[0295] A uma suspensão de hidreto de sódio (dispersão de 60% em óleo mineral, 0,185 g, 4,64 mmol) em THF (9 mL) foi adicionada uma solução do composto 107 (dietil (N-metoxi-N-metilcarbamoilmethyl)fosfonato) (1,06 g, 4,43 mmol) em THF (5 mL) a 0 °C. Após agitação durante 30 minutos, uma solução de composto 106 (0,903 g, 4,21 mmol) em THF (9 mL) foi adicionada gota a gota. A mistura de reação foi agitada durante 10 minutos a 0 °C, em seguida, extinta com solução aquosa saturada de NH₄Cl (30 mL) e extraída com acetato de etil (3 x 30 mL). A fase orgânica combinada foi lavada duas vezes com solução aquosa meio saturada de NaHCO₃. A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada e concentrada. Rendimento do composto 108: 1,40 g (supondo 100% de rendimento e usado na etapa subsequente sem purificação adicional).

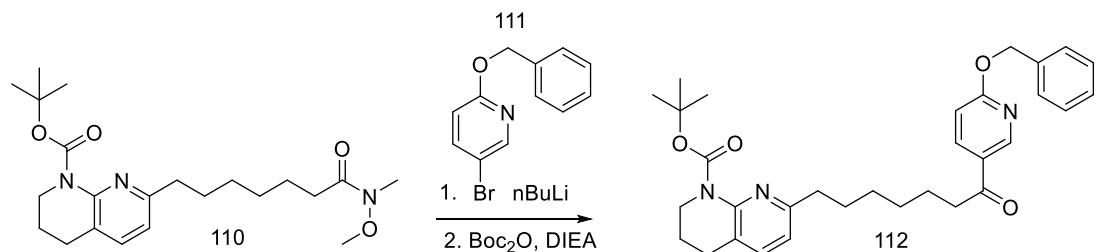


[0296] A uma solução do composto 108 (1,31 g, 4,38 mmol) em acetato de etila (20 mL) foi adicionado Pd/C (10% de carga, 0,466 g, 0,44 mmol). O vaso de reação foi pressurizado com H₂ a 50 PSI. Após agitação durante 3,5 horas, a mistura de reação foi filtrada sobre Celite® e enxaguada com metanol.

O filtrado foi concentrado e o composto 109 foi isolado por CombiFlash®, eluindo um gradiente de 50-100% de acetato de etilo em hexanos contendo 1% de trietilamina. Rendimento do composto 109: 0,833 g (62%).

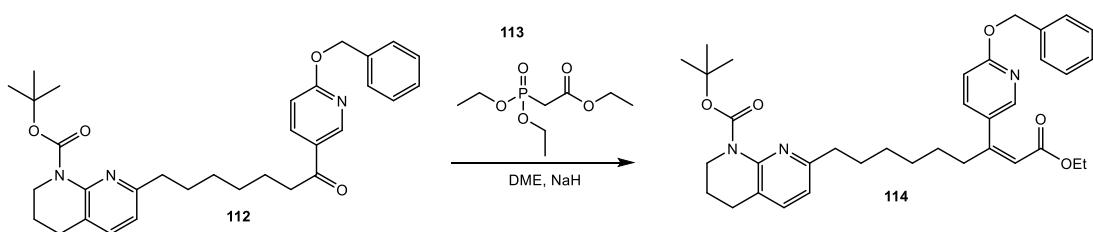


[0297] Foi adicionado a uma solução do composto 109 (0,833 g, 2,73 mmol) em THF (10 mL) DIEA (0,590 mL, 3,41 mmol) e dicarbonato de di-terc-butil (0,744 g, 3,41 mmol). A mistura de reação foi aquecida a 50 °C durante 5 horas. A reação estava incompleta com base em LC/MS e foram adicionadas partes adicionais de DIEA (0,590 mL, 3,41 mmol) e dicarbonato de di-terc-butil (0,744 g, 3,41 mmol). A mistura de reação foi aquecida a 50 °C durante 16 horas adicionais. A mistura de reação foi concentrada e o composto 110 foi isolado por CombiFlash®, eluindo com um gradiente de 50-100% de acetato de etilo em hexanos. Rendimento do composto 110: 0,934 g (84%).



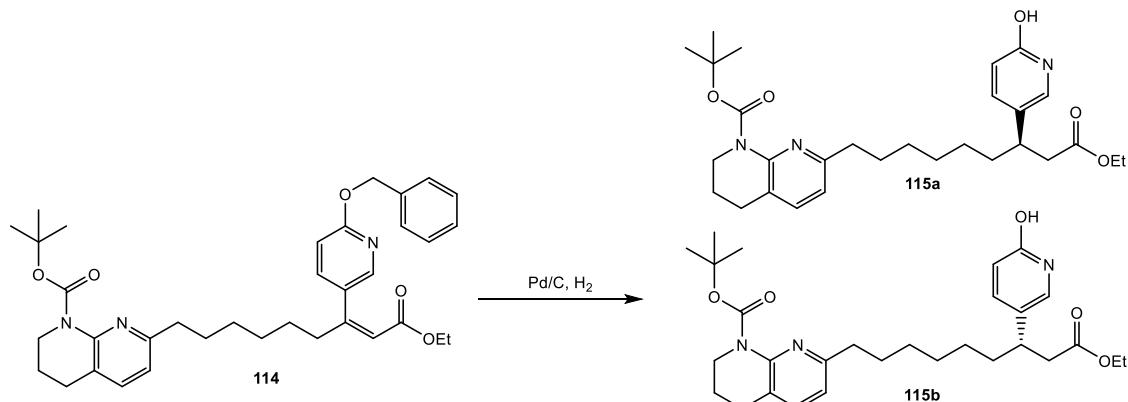
[0298] A uma solução de n-butil lítio (2,5 M em hexanos, 0,70 mL, 1,8 mmol) e THF (1,5 mL) foi adicionado o composto

111 (5-bromo-2-(fenilmetoxi)-piridina) (0,465 g, 1,8 mmol) como uma solução em THF (0,8 mL) gota a gota ao longo de 3 minutos a -78 °C. Foi adicionado então o composto 110 (0,535 g, 1,3 mmol) como uma solução em THF (1 mL). Após agitação durante 30 minutos, a reação foi aquecida a 0 °C, extinta com solução aquosa saturada de NH₄Cl (10 mL) e acidificada adicionalmente com HCl aquoso 6 M para um pH de 7. A mistura foi extraída com acetato de etila (3 x 10 mL). A fase orgânica combinada foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada e concentrada. Foi adicionado a uma solução do produto bruto em THF (8 mL) DIEA (0,94 mL, 5,4 mmol) e dicarbonato de di-terc-butil (1,18 g, 5,4 mmol). A mistura foi agitada a 40 °C durante a noite. A mistura de reação foi concentrada e o composto 112 foi isolado por CombiFlash®, eluindo com um gradiente de 0-40% de acetato de etilo em hexanos. Rendimento do composto 112: 471 mg (50%).



[0299] Foi adicionado o composto 113 (fosfonoacetato de trietil) (0,593 g, 2,65 mmol) como uma solução em dimetoxietano (1 mL) a 0 °C a uma suspensão de hidreto de sódio (dispersão de 60% em óleo mineral, 0,106 g, 2,65 mmol) em dimetoxietano (2 mL). Após agitação durante 20 minutos, a mistura de reação foi aquecida até em temperatura ambiente

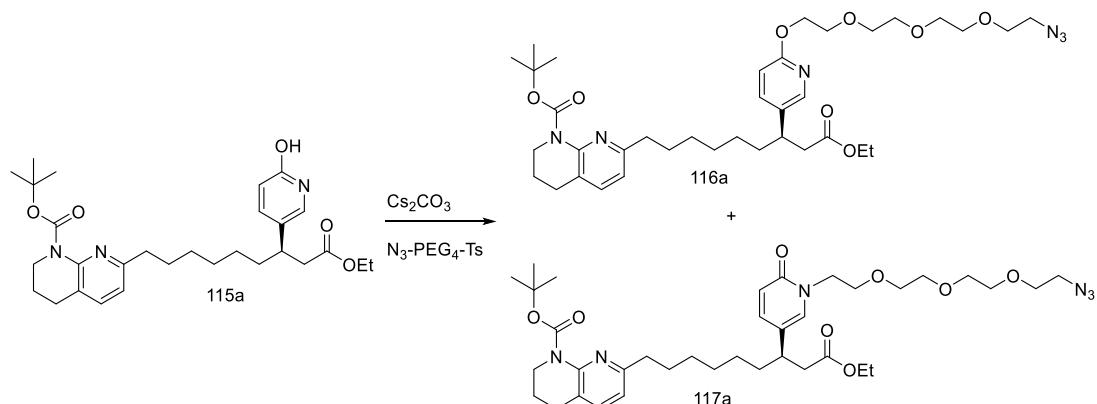
e foi adicionada uma solução do composto 112 (0,467 g, 0,88 mmol) em dimetoxietano (2 mL). A mistura de reação foi aquecida a 70 °C durante 4 horas. A reação foi extinta com solução aquosa saturada de NH₄Cl (10 mL) e o produto foi extraído com acetato de etila (3 x 15 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada, concentrada e o composto 114 foi isolado como uma mistura 1:1 de isômeros cis:trans por CombiFlash®, eluindo um gradiente de 0–30% de acetato de etila em hexanos. Rendimento do composto 114: 392 mg (74%).



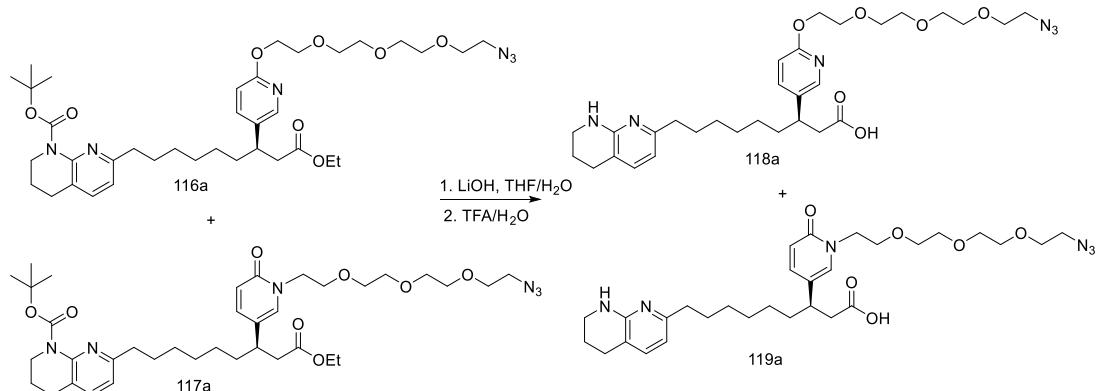
[0300] Foi adicionado Pd/C (carga de 10%, 69 mg, 0,07 mmol) a uma solução do composto 114 (390 mg, 0,65 mmol) em etanol (6 mL). O vaso de reação foi pressurizado com H₂ a 50 PSI. Após agitação durante 4 horas, a mistura de reação foi filtrada sobre Celite® e enxaguada com metanol. O filtrado foi concentrado e o composto 115 foi isolado como uma mistura racêmica por CombiFlash®, eluindo um gradiente de 0–10% de metanol em DCM. Rendimento do composto 115: 95 mg (29%). HPLC quiral semipreparativa (coluna 250 x 21 mm Chiraldpak® AD, 5 µm, 90/10 hexanos/EtOH, 40 mL/min.) foi usada para isolar 42 mg do primeiro isômero *R* de eluição

($R_T = 12-14$ M, > 99% ee, composto 115a) e 40 mg do segundo isômero S de eluição ($R_T = 15-18$ M, > 98% ee, composto 115b). A identidade dos isômeros R e S foi atribuída com base na ordem de eluição de um composto estruturalmente semelhante relatado por Coleman et al. 47 J. Med. Chem. 4834 (2004).

Estruturas **28c** **(*(R*)**-3-(6-(2-(2-(2-(2-
azidoetoxi)etoxi)etoxi)etoxi)piridin-3-il)-9-(5,6,7,8-ácido
tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)ácido nonanoico) e **31c** **(*(R*)**-
3-(1-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-6-oxo-1,6-
dihidropiridin-3-il)-9-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-
2-il)ácido nonanoico)



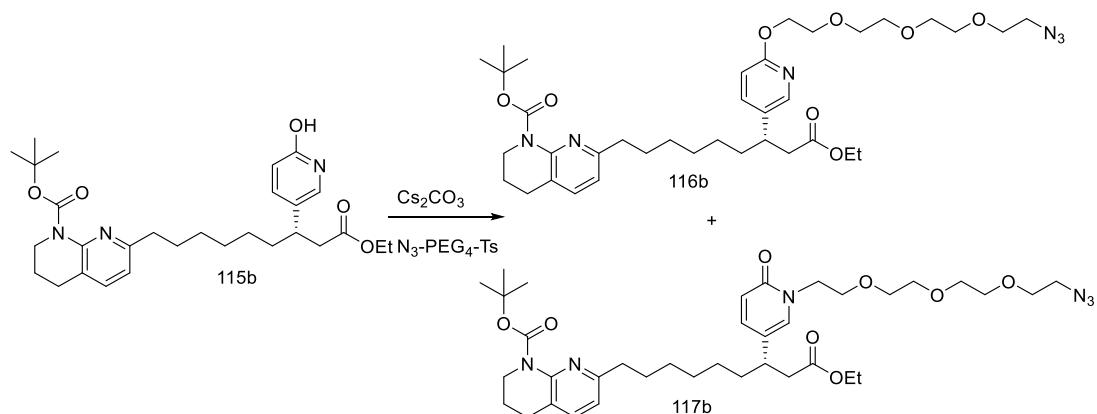
[0301] Foi adicionado carbonato de césio (53 mg, 0,16 mmol) a uma solução do composto 115a (41 mg, 0,08 mmol) e $\text{N}_3\text{-PEG}_4\text{-OTs}$ (61 mg, 0,16 mmol) em DMF (0,5 mL). A mistura de reação foi agitada a 40°C durante 1 hora. A mistura de reação foi extinta com solução aquosa de NaHCO_3 (1 mL) e extraída em seguida com acetato de etila (3 x 3 mL). A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida. A mistura bruta dos regioisômeros N- e O- alquilados foi usada em seguida sem purificação adicional.



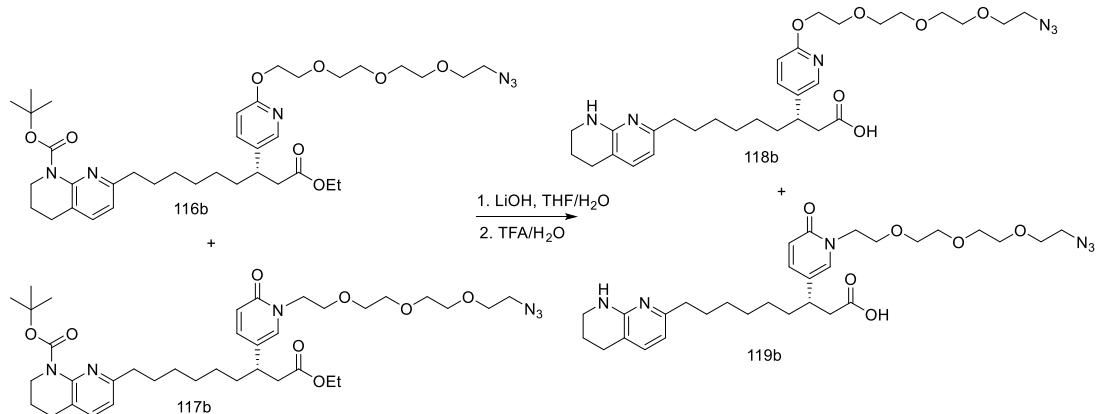
[0302] Foi adicionado hidróxido de lítio (6 mg, 0,25 mmol) a uma solução dos compostos 116a e 117a (58 mg, 0,08 mmol, mistura 4:6 de 9a:10a) em THF (1,0 mL) e água deionizada (1,0 mL). A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante 1 hora e depois a 35 °C durante 2 horas. Uma porção adicional de hidróxido de lítio (4 mg, 0,16 mmol) foi adicionada e a temperatura da reação foi aumentada para 40 °C. Após agitação durante 3 horas, foi adicionada uma porção final de hidróxido de lítio (4 mg, 0,25 mmol, total de 16 mg, 0,66 mmol). A mistura de reação foi agitada a 50 °C durante 3 horas. A mistura de reação foi acidificada para um pH de 7 com HCl aquoso 6 N e concentrada sob pressão reduzida. Os regioisômeros, compostos 118a e 119a, foram separados por CombiFlash®, eluindo um gradiente de 0-5% de metanol em DCM contendo 0,5% de ácido acético. O composto 118a foi ainda purificado por HPLC de fase reversa (Thermo Scientific™ Aquasil™ C18, 250 x 21,2 mm, 5 µm, 20 mL/min., 0,1% de TFA em água/ACN, eluição de gradiente), rendendo 13 mg de composto 118a (Estrutura 28c). O composto

119a foi purificado nas mesmas condições, produzindo 16 mg de composto 119a (Estrutura 31c).

Estruturas **29c** **(*(S*) -3- (6- (2- (2- (2-**
**azidoetoxi) etoxi) etoxi) etoxi) piridin-3-il) -9- (5,6,7,8-
tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il) ácido nonanoico) e **30c (*(S*) -**
3- (1- (2- (2- (2- (2-azidoetoxi) etoxi) etoxi) etil) -6-oxo-1,6-
dihidropiridin-3-il) -9- (5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-
2-il) ácido nonanoico)**

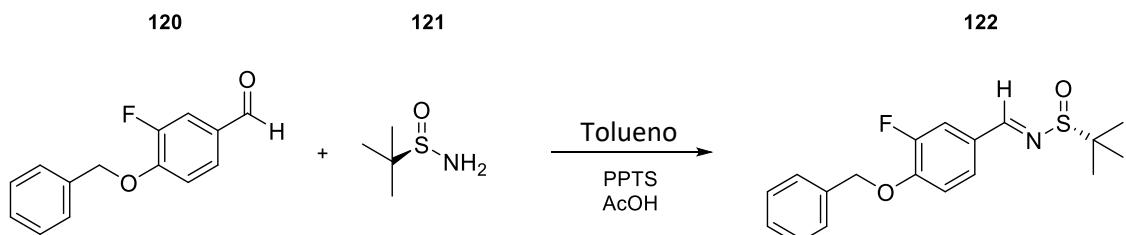


[0303] Foi adicionado carbonato de césio (51 mg, 0,16 mmol) a uma solução do composto 115b (40 mg, 0,08 mmol) e $\text{N}_3\text{-PEG}_4\text{-OTs}$ (58 mg, 0,16 mmol) em DMF (0,5 mL). A mistura de reação foi agitada a 40 °C durante 30 minutos. A mistura de reação foi extinta com solução aquosa de NaHCO_3 (1 mL) e extraída em seguida com acetato de etila (3 x 3 mL). A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida. A mistura bruta dos regioisômeros *N*- e *O*- alquilados foi usada em seguida sem purificação adicional.

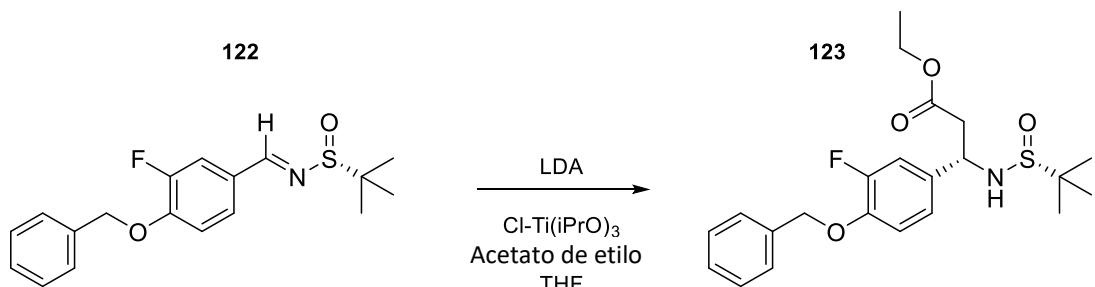


[0304] Foi adicionado hidróxido de lítio (6 mg, 0,25 mmol) a uma solução dos compostos 116b e 117b (56 mg, 0,08 mmol, mistura 4:6 de 9a:10a) em THF (0,75 mL) e água deionizada (0,75 mL). A mistura de reação foi agitada a 45 °C durante 2,5 horas. Uma porção adicional de hidróxido de lítio (6 mg, 0,25 mmol) foi adicionada e a mistura de reação foi agitada durante 2,5 horas. A temperatura da reação foi baixada para 35 °C e a mistura foi agitada durante a noite. A mistura de reação foi acidificada para pH=7 com HCl aquoso 6 N e concentrada sob pressão reduzida. Os regioisômeros, compostos 118b e 119b, foram separados por CombiFlash, eluindo um gradiente de 0-5% de metanol em DCM contendo 0,5% de ácido acético. O composto 118b foi ainda purificado por HPLC de fase reversa (Thermo Scientific™ Aquasil™ C18, 250 x 21,2 mm, 5 µm, 20 mL/min., 0,1% de TFA em água/ACN, eluição de gradiente), rendendo 14 mg de composto 118b (Estrutura 29c). O composto 119b foi purificado nas mesmas condições, produzindo 18 mg do composto 119b (Estrutura 30c).

Síntese da estrutura 32c ((R) -3- (4- (2- (2- azidoetoxi)etoxi)etoxi)-3-fluorofenil) -3- (N-metil-5- (5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)pentanamido)ácido propanoico)

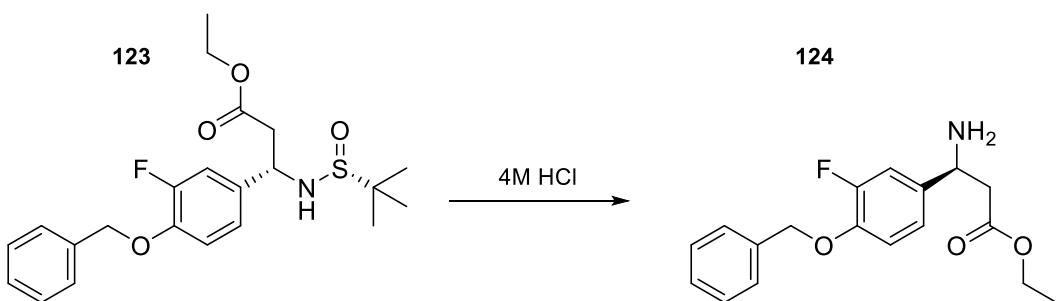


[0305] Foi adicionado o composto 121 (5,79 g, 47,78 mmol) ao composto 120 (2,75 g, 11,94 mmol) em tolueno (80 mL) em peneiras de 3Å, seguido por PPTS (300 mg, 1,19 mmol), em seguida, AcOH (683 uL, 11,94 mmol). A reação foi levada ao refluxo durante a noite. Após a conclusão, a reação foi extinta pela adição de bicarbonato de sódio saturado. A camada orgânica foi diluída com 2 volumes de acetato de etilo, separada e filtrada sobre sulfato de sódio. O produto foi isolado sobre sílica eluindo com um gradiente de acetato de etilo (0-30%) em hexano para produzir 2,054 g (54%).



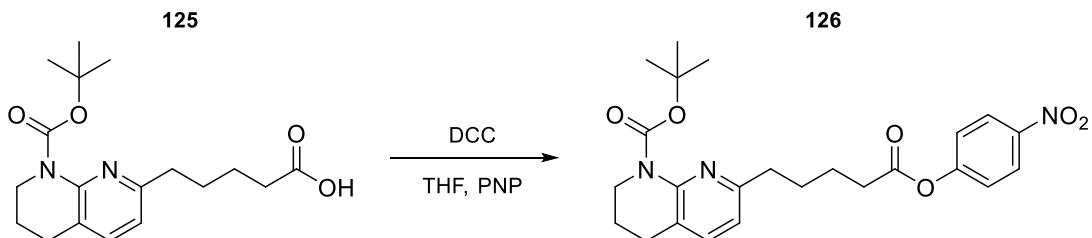
[0306] Foi adicionado uma solução 2,5 M de n-BuLi (7,76 mL, 19,41 mmol) gota a gota ao DIA (2,85 mL, 20,33 mmol) em THF (15 mL) a -78 °C. A agitação continuou

durante 5 minutos a -78 °C e foi adicionado acetato de etilo (1,81 mL, 18,48 mmol) gota a gota. A agitação continuou por mais 10 minutos a -78 °C e uma solução de triisopropóxido de cloro titânio (9,27 mL, 38,381 mmol) em THF (10 mL) foi adicionada gota a gota. A agitação continuou por mais 15 minutos a -78 °C e uma solução do composto 122 (2,054 g, 6,16 mmol) em THF (10 mL) foi adicionada gota a gota. A agitação continuou durante 1,5 hora a -78 °C. Após a conclusão, a reação foi extinta pela adição de bicarbonato de amônio saturado. A suspensão foi diluída com 6 volumes de acetato de etila e a camada orgânica foi separada, seca sobre sulfato de sódio, filtrada e concentrada. O produto foi isolado sobre sílica, eluindo com um gradiente de acetato de etilo em hexanos para produzir 1,043 g (53%).

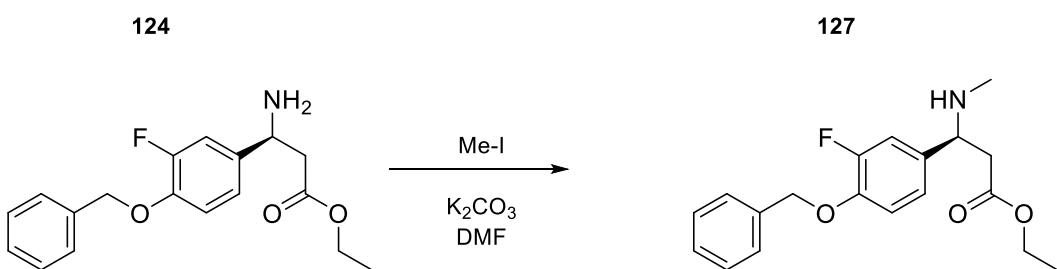


[0307] Foi adicionada uma solução de HCl 4 M em dioxano (3,09 mL, 12,37 mmol) ao composto 123 (1,043 g, 2,47 mmol) com agitação em MeOH (3 mL). Após a conclusão da desproteção, a solução foi diluída com água (8 mL) e lavada duas vezes com éter dietílico (6 mL). A camada aquosa foi em seguida ajustada para um pH de 11 com hidróxido de sódio. O precipitado foi extraído com acetato de etila e os extratos

orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio, filtrados e concentrados, rendendo 0,616 g (78,5%) do produto 124 que foi usado sem purificação adicional.

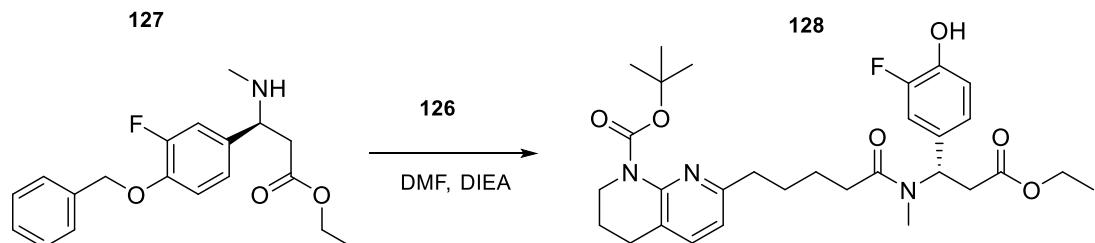


[0308] Foi adicionado DCC (68,1 mg, 0,331 mmol) ao composto 125 (92,1 mg, 0,275 mmol) em THF (1,5 mL) a 0 °C. Após 5 minutos, foi adicionado PNP (106,1 mg, 0,331 mmol), o banho de gelo foi removido e a agitação continuou durante 1 hora. Após a conclusão, a suspensão foi resfriada a -20 °C durante 1 hora e o precipitado foi removido por filtração. O sobrenadante foi concentrado e para render 129 mg (103%) do produto bruto 126, que foi usado em seguida sem purificação adicional.

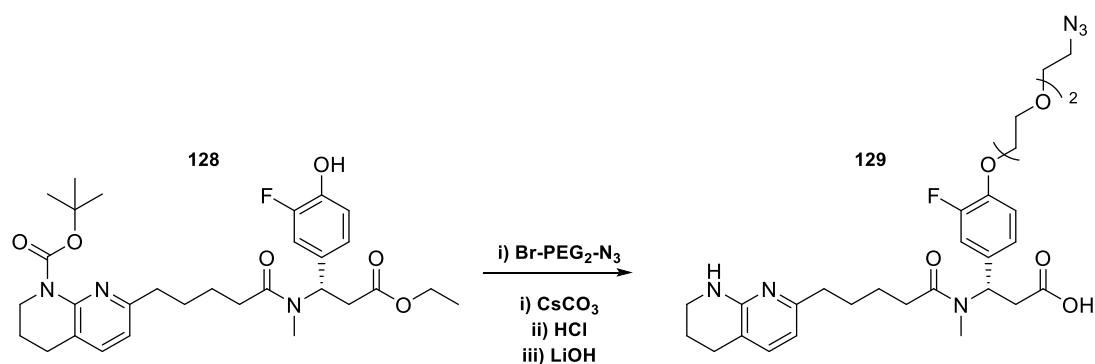


[0309] Uma mistura contendo o composto 124 (148,6 mg, 0,468 mmol) e carbonato de potássio (129 mg, 0,937 mmol) em DMF (2 mL) foi tratada com iodeto de metila (66,5 mg, 0,468 mmol) e agitada a 50 °C durante 3 horas. Após a conclusão da alquilação, todos os voláteis foram removidos e o produto foi isolado sobre sílica, eluindo um gradiente

de acetato de etila em hexanos, cada um tamponado com 1% de TEA, para produzir 94,6 mg (61%).



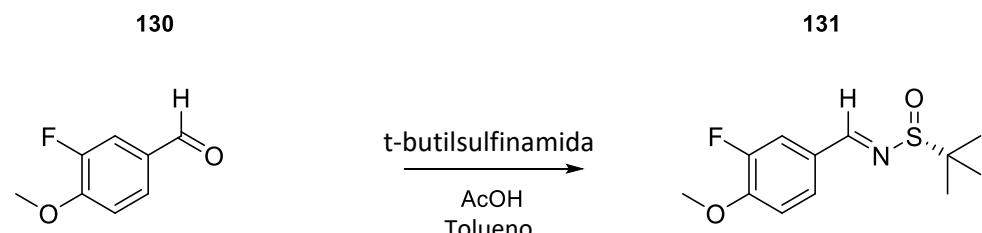
[0310] Foi adicionado DIEA (149 μL , 0,856 mmol) ao composto 127 (94,5 mg, 0,285 mmol) em DMF (2 mL), seguido pelo composto 126 (129,9 mg, 0,285 mmol) e a mistura foi agitada durante 1 hora a 80 °C. Após a conclusão, todos os voláteis foram removidos e o produto bruto foi dissolvido em MeOH, tratado com paládio a 10% sobre carbono (20 mg) e o frasco foi carregado com 60 PSI de hidrogênio. Após a conclusão, a suspensão foi filtrada. O sobrenadante foi concentrado e o produto bruto obtido foi utilizado em seguida sem purificação adicional.



[0311] Uma mistura contendo composto 128 (159 mg, 0,285 mmol), bromo-PEG₂-azida (74,7 mg, 0,314 mmol) e carbonato de césio (204 mg, 0,627 mmol) em DMF (2 mL) foi aquecida a 60 °C durante 2 horas. Após a conclusão, todos os

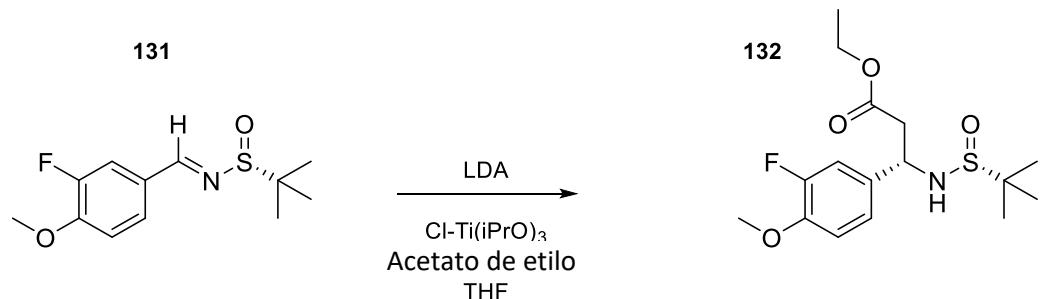
voláteis foram removidos e o produto bruto foi tratado com HCl 4 M em dioxano (0,5 mL, 2 mmol) e aquecido a 40 °C durante 3 horas. Após a conclusão, todos os voláteis foram removidos. O produto bruto foi suspenso em uma mistura de THF (1 mL), MeOH (1,5 mL) e H₂O (1,5 mL), tratado com hidróxido de lítio (83,5 mg, 3,48 mmol) e aquecido a 40 °C durante 16 horas. Após a conclusão, o pH foi ajustado para 3 com TFA e o produto foi isolado por separação em uma coluna Phenomenex® Gemini® C18 (21,2 x 250 mm, 5 microns) eluindo um gradiente de acetonitrila em água contendo 0,1% de TFA para render 33,1 mg (20%).

Síntese da estrutura 33c (ácido (R)-1-azida-13-(3-fluoro-4-metoxifenil)-12-(5-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)pentanoil)-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-15-óico)

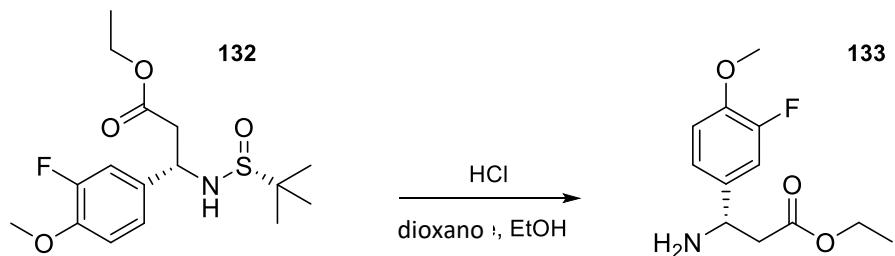


[0312] Uma mistura contendo composto 130 (1,5 g, 9,73 mmol), (R) t-butilsulfinamida (2,36 g, 19,46 mmol) e ACOH (0,14 mL) em tolueno (45 mL) foi submetida a refluxo em um frasco equipado com uma armadilha Dean-Stark por 16 horas. Após a conclusão, a reação foi extinta pela adição de bicarbonato de sódio saturado. A camada orgânica foi separada, seca sobre sulfato de sódio, filtrada e concentrada. O produto foi isolado por separação sobre sílica

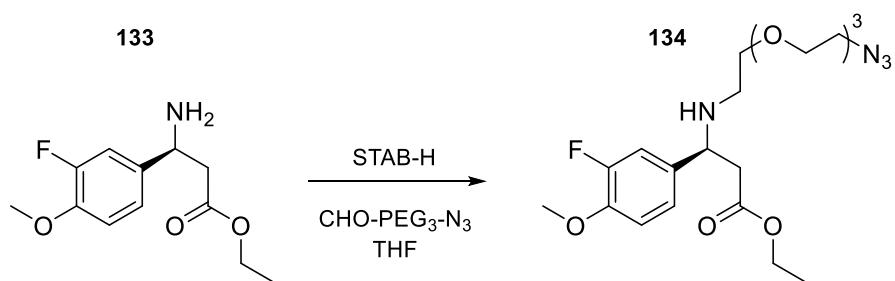
eluindo um gradiente de acetato de etilo em hexanos para produzir 1,714 g (68,4%).



[0313] Foi adicionado uma solução 2,5 M de n-BuLi (8,324 mL, 20,81 mmol) gota a gota ao DIA (3,056 mL, 21,80 mmol) em THF (18 mL) a -78 °C. A agitação continuou durante 5 minutos a -78 °C e foi adicionado acetato de etila (1,94 mL, 19,82 mmol) gota a gota. A agitação continuou por mais 10 minutos a -78 °C e uma solução de triisopropóxido de cloro titânio (9,94 mL, 41,62 mmol) em THF (10 mL) foi adicionada gota a gota. A agitação continuou por mais 15 minutos a -78 °C e uma solução do composto 131 (1,70 g, 6,61 mmol) em THF (12 mL) foi adicionada gota a gota. A agitação continuou durante 1,5 hora a -78 °C. Após a conclusão, a reação foi extinta pela adição de bicarbonato de amônio saturado. A suspensão foi diluída com 7 volumes de acetato de etila e a camada orgânica foi separada, seca sobre sulfato de sódio, filtrada e concentrada. O produto foi isolado sobre sílica, eluindo com um gradiente de acetato de etila em hexanos para produzir 0,984 g (43%).

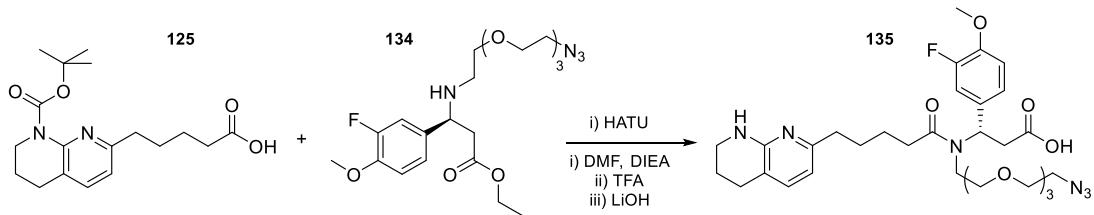


[0314] Foi adicionado HCl 4 M (2,12 mL, 8,47 mmol) em dioxano ao composto 132 (0,975 g, 2,82 mmol) em EtOH (6 mL) a 0 °C e agitado durante 30 minutos. Após a conclusão, a reação foi diluída com água (15 mL) e lavada com éter dietílico. A camada orgânica foi separada e o pH da camada aquosa foi ajustado para 12 com hidróxido de sódio. A camada aquosa foi lavada com 5 volumes de acetato de etilo e a camada orgânica foi separada, filtrada sobre sulfato de sódio e concentrada. O produto foi isolado por separação sobre sílica eluindo um gradiente de acetato de etilo em hexanos contendo 1% de TEA para produzir 0,434 g (64%).



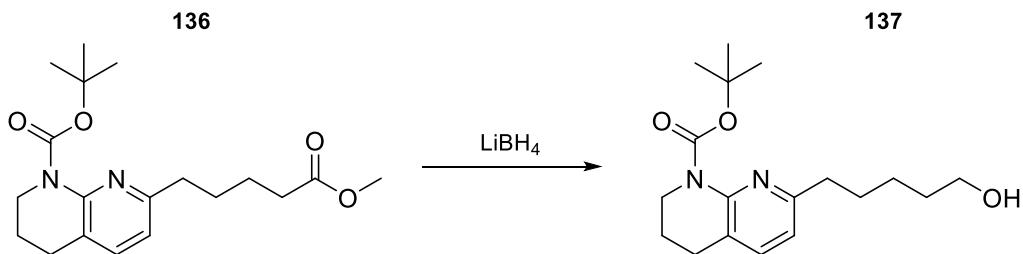
[0315] A uma mistura do composto 133 (0,120 g, 0,497 mmol) e PEG (0,151 g, 0,696 mmol) em THF (2 mL) ao longo de peneiras moleculares de 3 Å foi adicionado STAB-H (0,253 g, 1,19 mmol) e a suspensão foi agitada durante 16 horas em temperatura ambiente. Após a conclusão, a reação foi extinta pela adição de bicarbonato de sódio saturado e

o produto bruto foi extraído com três partes de acetato de etila. Os extratos orgânicos separados foram combinados, secos sobre sulfato de sódio, filtrados e concentrados. O produto bruto obtido foi utilizado em seguida sem purificação adicional.

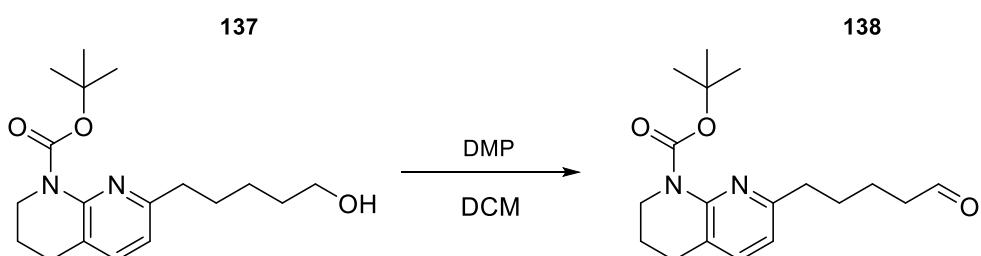


[0316] O composto 134 (0,200 g, 0,597 mmol) em DMF (2 mL) foi tratado com HATU (0,227 g, 0,597 mmol) e agitado durante 5 minutos. Foi adicionado DIEA (0,259 mL, 1,49 mmol) ao éster ativado, seguido pelo composto 125 (0,220 g, 0,497 mmol) em DMF (1 mL) e a mistura resultante foi agitada durante 1 hora. Todos os voláteis foram removidos e o produto bruto resultante foi tratado com TFA puro (3,8 mL) e agitado durante 3 horas a 40 °C. Após a conclusão da remoção de BOC, todos os voláteis foram removidos e o produto bruto foi suspenso em uma mistura de THF (4 mL), água (8 mL) e MeOH (8 mL). A mistura resultante foi tratada com LiOH (71,6 mg, 2,98 mmol) e aquecida a 40 °C durante 16 horas. Após a conclusão, o pH foi ajustado para 3 com TFA e o produto foi isolado por separação em uma coluna Phenomenex® Gemini® c18 (21,2 x 250 mm, 5 microns) eluindo um gradiente de acetonitrila em água contendo 0,1% de TFA para render 56,2 mg (18%, 3 etapas).

Síntese da estrutura 34c (ácido (S)-1-azida-13-(3-fluoro-4-metoxifenil)-12-(5-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)pentil)-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-15-óico)

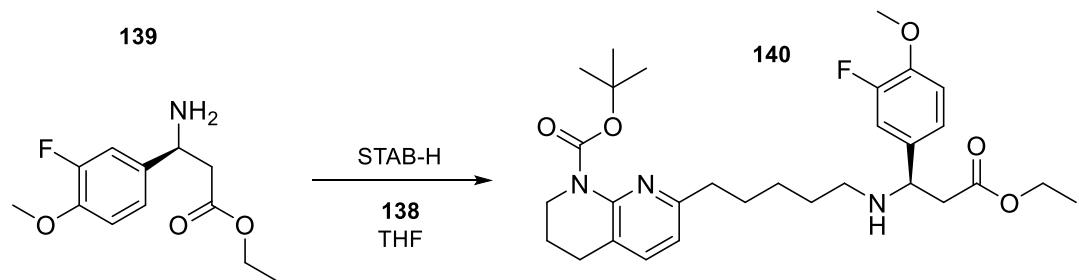


[0317] O composto 136 (0,500 g, 1,45 mmol) em uma mistura de THF (9,0 mL) e MeOH (0,5 mL) a 0 °C foi tratado com boro-hidreto de lítio (94,5 mg, 4,34 mmol). O resfriamento foi removido e a agitação continuou até cessar a evolução do gás. A mistura de reação foi diluída com 5 volumes de EtOAc. A camada orgânica foi lavada com bicarbonato de amônio, seca sobre sulfato de sódio, filtrada e concentrada. O produto foi isolado por eluição sobre sílica usando um gradiente de acetato de etilo em hexanos para produzir 309 mg (67%).

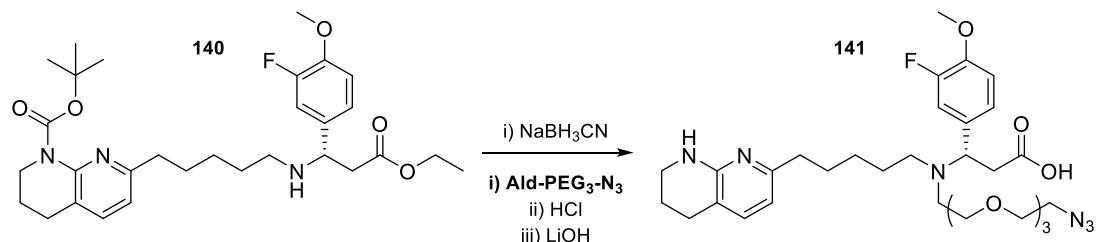


[0318] Foi adicionado o reagente de Martin em várias partes a uma solução contendo o composto 137 (0,305 g, 0,952 mmol) em DCM (9 mL) a 0 °C. Foram adicionadas várias gotas de água, o resfriamento foi removido e a reação foi agitada durante 3 horas. Após a conclusão, a mistura foi lavada com bicarbonato de sódio saturado e depois com

tiosulfato de sódio saturado. O orgânico separado foi seco sobre sulfato de sódio, filtrado e concentrado. O produto 138 foi separado sobre sílica eluindo com um gradiente de MeOH em DCM para produzir 140 mg (46%).



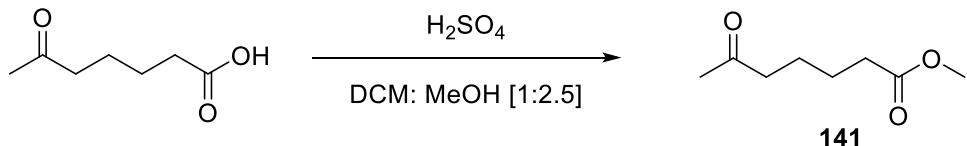
[0319] Foi adicionado STAB-H (0,150 g, 0,706 mmol) a uma mistura do composto 1 (85,2 mg, 0,353 mmol) e 138 (134,9 mg, 0,424 mmol) em THF (2,5 mL) ao longo de peneiras moleculares de 3Å e a suspensão foi agitada durante 16 horas a 40 °C. Após a conclusão, a reação foi diluída com 5 volumes de acetato de etila e tratada com bicarbonato de sódio saturado. A camada orgânica foi separada, seca sobre sulfato de sódio, filtrada e concentrada. O produto foi isolado por separação sobre sílica, eluindo um gradiente de MeOH em DCM contendo 1% de TEA para produzir 64 mg (33%).



[0320] Foi adicionado cianoboro-hidreto de sódio (28,9 mg, 0,276 mmol) a uma mistura contendo o composto 140 (60 mg, 0,110 mmol), Ald-PEG₃-N₃ (71,9 mg, 0,331 mmol) e AcOH

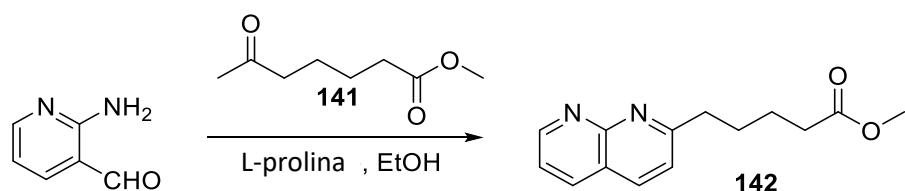
(3 µL, 0,0276 mmol) em MeOH (1 mL) ao longo de peneiras moleculares de 3Å e a reação foi agitada a 40 °C durante 3 horas. Após a conclusão, a mistura foi resfriada a 0 °C, água foi adicionada (0,15 mL) e a solução foi acidificada para um pH de 7 usando HCl (4 M) em dioxano. Todo o metanol foi em seguida removido, foi adicionado HCl 4 M (0,138 mL, 0,552 mmol) em dioxano e a mistura foi agitada a 40 °C durante 2 horas. Após a conclusão da remoção de BOC, todos os voláteis foram removidos e o produto bruto foi suspenso em uma mistura de THF (1 mL), água (2 mL) e MeOH (2 mL) e tratado com hidróxido de lítio (26,5 mg, 1,104 mmol). Após a conclusão da remoção do éster, o pH foi ajustado para 3 por adição de TFA e o produto foi isolado por separação em uma coluna Phenomenex® (21,2 x 250 mm) C18 eluindo um gradiente de acetonitrila em água contendo 0,1% de TFA para render 16,4 mg (24%, 3 etapas).

Síntese da estrutura 36c (ácido (S)-3-(4-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etoxi)-3-fluorofenil)-9-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)nonanoico)

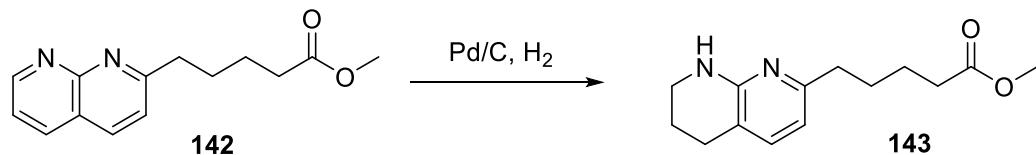


[0321] Foi adicionado H₂SO₄ conc. (0,18 mL, 3,4 mmol) a uma solução de ácido 6-oxoheptanoico (9,74 g, 68 mmol) em DCM (30 mL) e MeOH (75 mL) em temperatura ambiente. A mistura de reação foi refluxada durante a noite. A mistura de reação

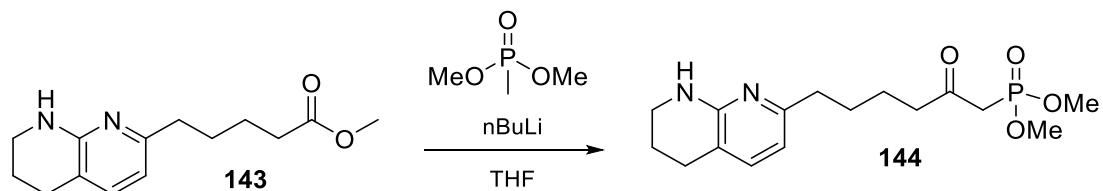
foi então concentrada em um óleo, redissolvida em DCM (150 mL) e lavada com solução sat. aq. NaHCO₃ (2 x 40 mL) e salmoura (40 mL). A camada orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada e concentrada. O produto foi usado na próxima etapa sem purificação adicional. Rendimento do composto 141: 10,2 g (95%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 3,58 (s, 3H), 2,43 (t, 2H), 2,29 (t, 2H), 1,46 (m, 4H).



[0322] Foi adicionado L-prolina (3,72 g, 32 mmol) a uma solução do composto 141 (10,2 g, 65 mmol) e 2-amino-3-formilpiridina (7,89 g, 65 mmol) em EtOH (80 mL). A mistura de reação foi aquecida ao refluxo durante a noite. A mistura de reação foi então concentrada, dissolvida em EtOAc (50 mL) e lavada com água (3 x 30 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por CombiFlash usando sílica gel como fase estacionária e eluído com um gradiente de EtOAc em DCM (10-100%). Rendimento do composto 142: 6,08 g (39%). Massa calculada para C₁₄H₁₆N₂O₂ [M+H]⁺: 245,13, encontrado: 245,21.

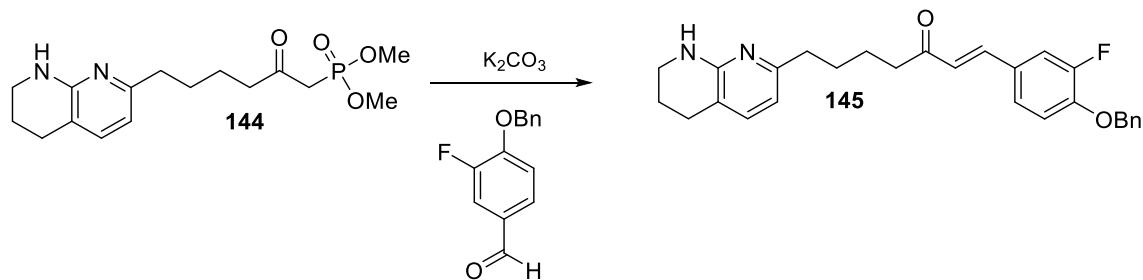


[0323] A uma solução do composto 142 (6,08 g, 24,9 mmol) em MeOH (50 mL) foi adicionado Pd/C (carga de 10%, tipo Degussa, 1,99 g, 1,87 mmol). O frasco de reação foi carregado com nitrogênio, evacuado e preenchido com nitrogênio três vezes. Este processo foi repetido com hidrogênio e o vaso de reação foi finalmente carregado com hidrogênio (1 atm) e agitado durante a noite em temperatura ambiente. A mistura de reação foi filtrada sobre Celite®, a almofada enxaguada com MeOH e o filtrado concentrado. O produto, composto 143, foi usado na próxima etapa sem purificação adicional supondo 100% de rendimento. Massa calculada para $C_{14}H_{20}N_2O_2 [M+H]^+$: 249,16, encontrado: 249,08.

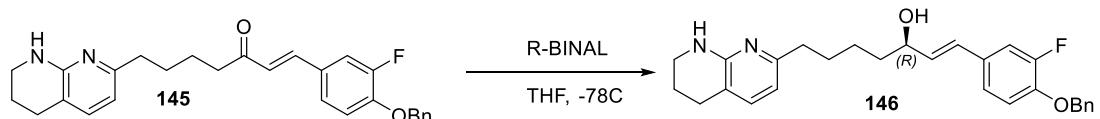


[0324] Foi adicionada solução de n-BuLi (2,5 M em hexanos, 40 mL, 100 mmol) a uma solução de dimetil metilfosfonato (12,3 g, 100 mmol) em THF anidro (120 mL) por meio de uma bomba de seringa durante 1 h a -78 °C. Uma solução do composto 143 (6,175 g, 24,9 mmol) em THF (40 mL) foi adicionada à mistura de reação ao longo de 45 M a -78 °C. Após agitação durante 20 M a -78 °C, a mistura de reação foi extinta com solução aq. sat. de NH₄Cl (200 mL), aquecida em temperatura ambiente e extraída com EtOAc (400 mL). A camada orgânica foi lavada com água (200 mL) e salmoura

(200 mL). A fase orgânica foi separada, seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e concentrada. O produto foi usado na próxima etapa sem purificação adicional. Rendimento do composto 144: 7,86 g (93%). Massa calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 341,17, encontrado: 341,17.



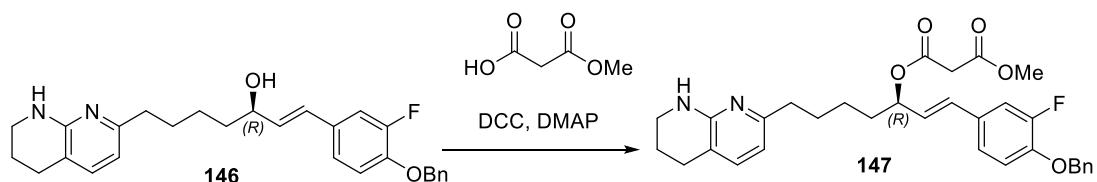
[0325] Uma suspensão de 3-fluoro-4-(fenilmethoxi)-benzaldeído (0,38 g, 1,65 mmol), composto 144 (0,67 g, 1,98 mmol) e carbonato de potássio anidro (0,547 g, 3,96 mmol) em THF (13,5 mL) foi aquecida ao refluxo durante a noite. 3-fluoro-4-(fenilmethoxi)-benzaldeído (0,19 g, 0,83 mmol) e carbonato de potássio (0,23 g, 1,65 mmol) adicionais foram adicionados e a mistura de reação foi submetida a refluxo por mais 4 h. A mistura foi diluída com EtOAc (100 mL) e lavada com água (30 mL) e salmoura (30 mL). A fase orgânica foi separada, seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por CombiFlash usando sílica gel como fase estacionária e foi eluído com um gradiente de MeOH em DCM (0-10%). Rendimento do composto 145: 446 mg (61%). Massa calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{FN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 445,23, encontrado: 445,41.



[0326] Preparação de R-BINAL: Foi adicionado EtOH (0,492 g, 10,65 mmol, 1,00 eq) a uma pasta de LAH (0,396 g, 10,4 mmol, 0,98 eq) THF seco (34 mL) como uma solução em THF (3,2 mL) ao longo de 10 M, mantendo uma temperatura interna de <35 °C. Após envelhecimento por 30 M, R-BINOL (3,05 g, 10,65 mmol, 1,00 eq) foi adicionado como uma solução em THF (10 mL), mantendo uma temperatura interna de <35 °C (cerca de 10 minutos). Após agitação durante 2 h em temperatura ambiente, a mistura de reação foi resfriada em um banho de gelo seco/acetona até -78 °C.

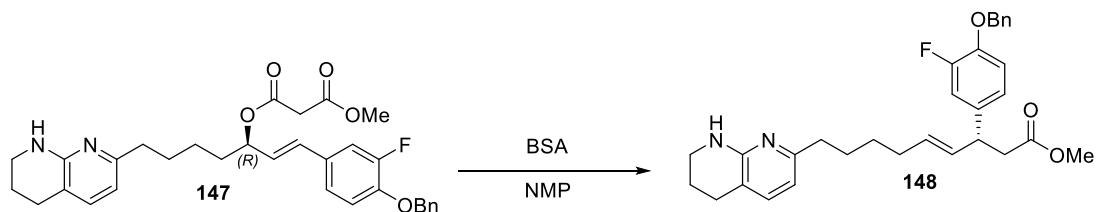
[0327] O composto 145 (1,18 g, 2,65 mmol) foi seco azeotropicamente com tolueno anidro (50 mL) e foi dissolvido em THF anidro (12 mL). A solução do composto 145 foi adicionada gota a gota à solução de R-BINAL por meio de uma bomba de seringa ao longo de 45 M a -78 °C. Após 1,5 h, o vaso de reação foi transferido para um esgoto muito grande, cheio com gelo seco/acetona e coberto com folha de alumínio. A mistura de reação foi agitada ON a -78 °C. A maior parte da redução ocorreu nas primeiras 1,5 h, com somente uma pequena conversão adicional durante a noite. A reação foi extinta pela adição de NH₄Cl (150 mL) aq. sat. e aquecido em temperatura ambiente. A mistura foi posteriormente acidificada para pH=7 usando HCl 6 N e depois extraída com

EtOAc (2×250 mL). A fase orgânica combinada foi lavada com água (125 mL) e salmoura (125 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por CombiFlash usando sílica gel como fase estacionária e foi eluído com um gradiente de MeOH em DCM (0-5%). Rendimento do composto 146: 634 mg (53%). A pureza quiral foi determinada por HPLC quiral analítico, coluna Chiraldpak AD-H $4,6 \times 250$ mm, 5 microns, EtOH 0,1% dietilamina isocrática, $1,75$ mL/min. O primeiro isômero R a eluir tinha 86% de área pura, correspondendo a 72% ee. O composto 6 foi ainda purificado por HPLC quiral semipreparativa (Chiraldpak AD-H $21,2 \times 250$ mm, 5 microns, EtOH 0,1% dietilamina, 20 mL/min). Rendimento final do composto 146: 445 mg (98% ee). Massa calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{31}$ FN_2O_2 $[\text{M}+\text{H}]^+$: $447,25$, encontrado: $447,30$.

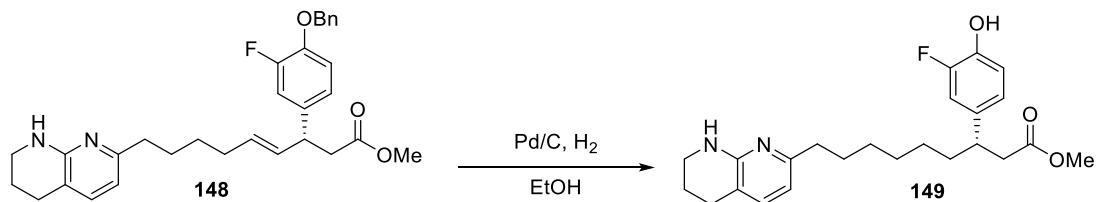


[0328] Foi adicionado uma solução de DMAP (9 mg, $0,073$ mmol) em DCM a uma solução do composto 146 ($0,325$ g, $0,73$ mmol) e éster monometílico do ácido malônico ($0,103$ g, $0,87$ mmol) em DCM (3 mL). A mistura foi resfriada a 0 °C e o DCC ($0,180$ g, $0,87$ mmol) foi adicionado. O banho de resfriamento foi removido e a reação foi agitada em RT ON. A mistura de reação foi então diluída com DCM (10 mL) e

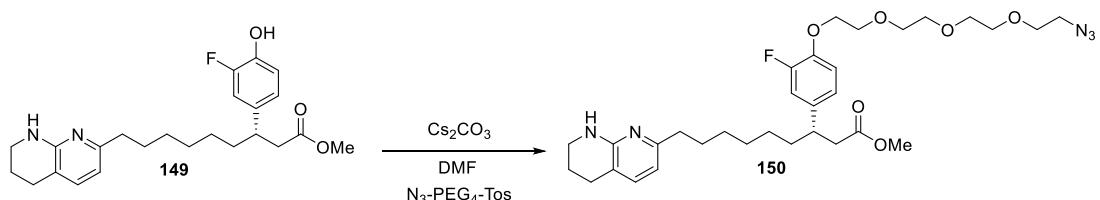
filtrada. O filtrado foi concentrado e purificado por CombiFlash usando sílica gel como fase estacionária, eluindo com um gradiente de MeOH (0–5%) em DCM. Rendimento do composto 147: 142 mg (37%). Massa calculada para $C_{32}H_{35} FN_2O_5$ $[M+H]^+$: 547,26, encontrado: 547,58.



[0329] Foi adicionado *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (0,229 g, 1,12 mmol) a uma solução do composto 147 (0,232 g, 0,42 mmol) em NMP (0,5 mL) em temperatura ambiente. A mistura foi aquecida a 60 °C durante 30 min. Foi adicionada salmoura (58 µL) em duas porções ao longo de 5 M. A mistura de reação foi então aquecida a 90 °C durante 3 h, em seguida, em temperatura ambiente durante a noite. A mistura de reação foi diluída com EtOAc (12 mL) e lavada com água (3 mL). A camada aquosa foi extraída de novo com EtOAc (12 mL). A camada orgânica combinada foi concentrada. O resíduo foi purificado por CombiFlash usando sílica gel como fase estacionária e foi eluído com um gradiente de MeOH em DCM. Rendimento do composto 148: 140 mg (66%). Massa calculada para $C_{31}H_{35} FN_2O_3$ $[M+H]^+$: 503,27, encontrado: 503,29.

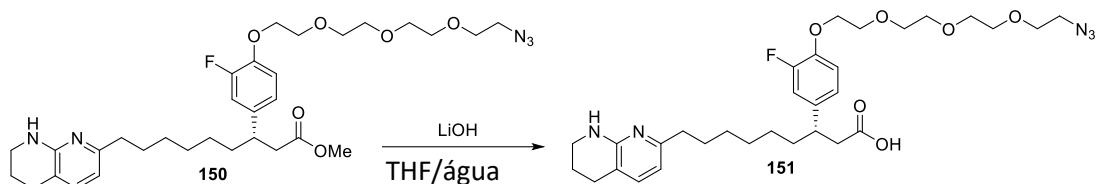


[0330] A uma solução do composto 148 (0,169 g, 0,34 mmol) em EtOH (3 mL) foi adicionada uma pasta de Pd/C (10% de carga, 36 mg, 0,034 mmol) em EtOH (1 mL). O vaso de reação foi pressurizado e ventilado com hidrogênio três vezes. O vaso de reação foi repressurizado a 55 psi por 3 h. A mistura de reação foi diluída com MeOH (5 mL) e filtrada. O filtrado foi concentrado e o produto, composto 149, foi usado na próxima etapa sem purificação adicional, supondo 100% de rendimento. Massa calculada para $C_{24}H_{31} FN_2O_3 [M+H]^+$: 415,24, encontrado: 415,07.



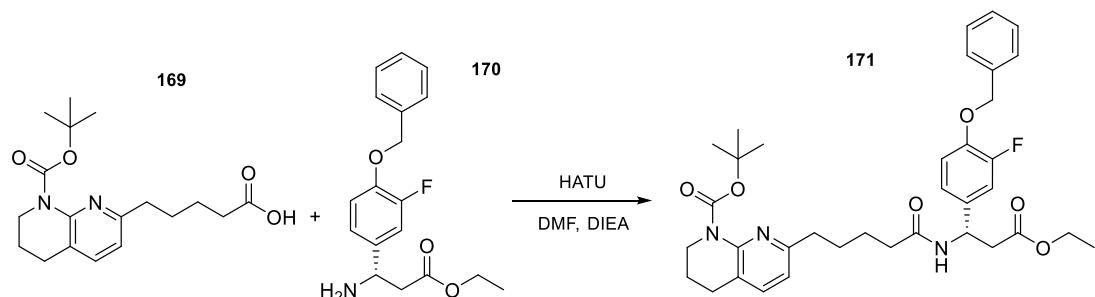
[0331] Foi adicionado carbonato de césio (164 mg, 0,50 mmol) a uma solução do composto 149 (139 mg, 0,34 mmol) e azida-PEG₄-tosilato (0,188 mg, 0,50 mmol) em DMF (2,5 mL). A mistura de reação foi aquecida a 40 °C durante 1 h, em seguida, extinta com NaHCO₃ aq. sat. (3 mL). A mistura foi extraída com EtOAc (3 x 10 mL). A fase orgânica combinada foi lavada com água (2 x 5 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada, concentrada e usada na próxima etapa.

sem purificação adicional. Massa calculada para C₃₂H₄₆ FN₅O₆ [M+H]⁺: 616,35, encontrado: 616,90.

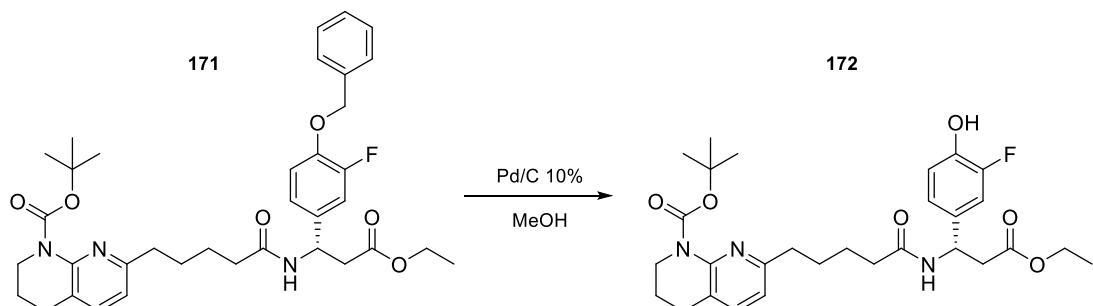


[0332] Foi adicionado hidróxido de lítio (0,040 g, 1,68 mmol) a uma solução do composto 150 (0,207 mg, 0,34 mmol) em THF (1,5 mL) e água (1,5 mL). A mistura de reação foi aquecida a 40 °C durante a noite. Na manhã seguinte, a mistura de reação foi acidificada com HCl 6 N até pH=7 e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em 35% ACN em H₂O, 0,1% TFA e purificado por RP-HPLC (Thermo Aquasil C18, 250 x 21 mm, 5 µm, 20 mL/min, gradiente de ACN em H₂O contendo 0,1% TFA). Rendimento do composto 151 (SM 36): 125 mg (52% em 3 etapas). Massa calculada para C₃₁H₄₄ FN₅O₆ [M+H]⁺: 602,34, encontrado: 602,85.

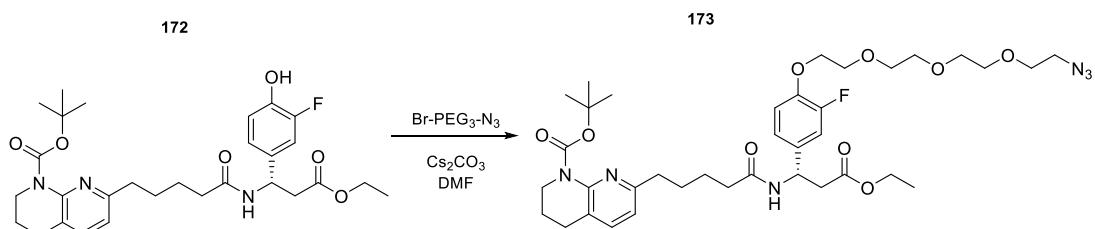
Síntese da estrutura 37c (ácido (S)-3-(4-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)-3-fluorofenil)-3-(5-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)pentanamido)propanoico)



[0333] O composto 169 (90 mg, 0,268 mmol) em DMF (1,5 mL) foi tratado com HATU (112 mg, 0,295 mmol) e agitado durante 5 minutos. Uma mistura contendo o composto 170 (94 mg, 0,295 mmol) e DIEA (0,154 mL, 0,884 mmol) em DMF (0,5 mL) foi adicionada em seguida e a agitação foi continuada durante 1 hora. Após a conclusão, todos os voláteis foram removidos e o composto 171 foi isolado por separação sobre sílica eluindo um gradiente de MeOH em DCM, rendendo 123 mg (72%).

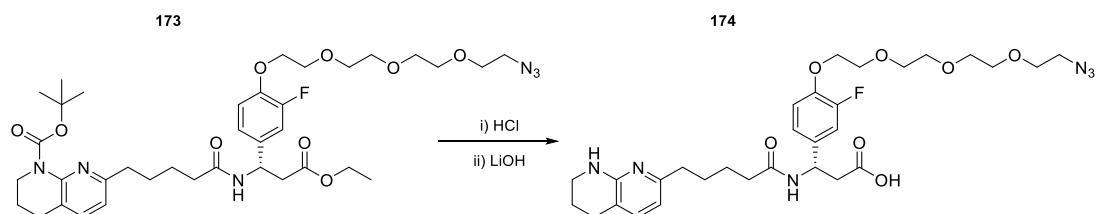


[0334] Uma suspensão contendo 10% de paládio sobre carbono (21 mg, 0,0194 mmol) e composto 171 (123 mg, 0,194 mmol) em MeOH (2 mL) foi carregada com 60 PSI de hidrogênio e agitada durante 1 hora. Após a conclusão, a suspensão foi filtrada sobre Celite® e concentrada para render 88 mg (83%) de produto bruto, usado em seguida sem purificação adicional.



[0335] Uma suspensão contendo o composto 172 (87 mg, 0,160 mmol), Br-PEG₃-N₃ (50 mg, 0,176 mmol) e carbonato de

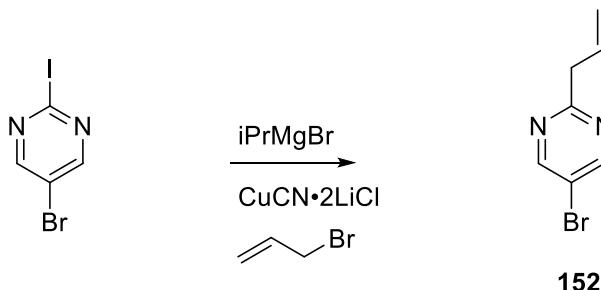
césio (115 mg, 0,352 mmol) em DMF (1 mL) foi aquecida a 60 °C e agitada durante 2 horas. Após a conclusão, todos os voláteis foram removidos e o composto 173 foi isolado por separação sobre sílica eluindo um gradiente de MeOH em DCM, rendendo 91 mg (76%).



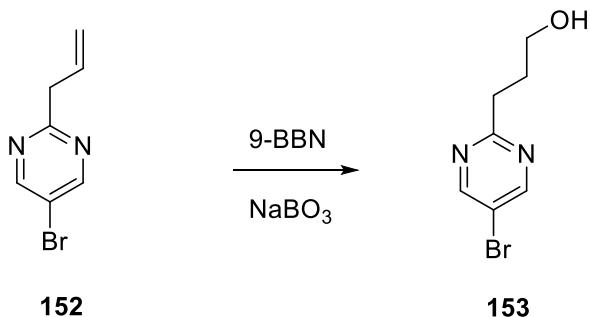
[0336] O composto 173 (50 mg, 0,067 mmol) em dioxano (0,5 mL) foi tratado com uma solução de HCl 4M (0,671 mmol, 0,168 mL) em dioxano e agitado a 40 °C durante 3 horas. Após a conclusão, todos os voláteis foram removidos. O produto bruto foi dissolvido em uma mistura de H₂O (0,4 mL), THF (0,2 mL) e MeOH (0,4 mL), tratado com LiOH (8 mg, 0,356 mmol) e agitado a 40 °C durante 16 horas. Após a conclusão, o pH foi ajustado para 3 com TFA e o produto foi isolado por separação em uma coluna Phenomenex Gemini C18 (21,2 x 250 mm, 5 microns) eluindo um gradiente de acetonitrila em água contendo 0,1% de TFA para render 25 mg (60%, 2 etapas).

Síntese da estrutura 38c (ácido (S)-3-(2-(3-((2-(2-(2-(azidoetoxi)etoxi)etil)amino)-3-oxopropil)pirimidin-5-il)-9-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)nonanoico) e estrutura 39c (ácido (S)-3-(2-(1-azida-12-oxo-3,6,9-trioxa-

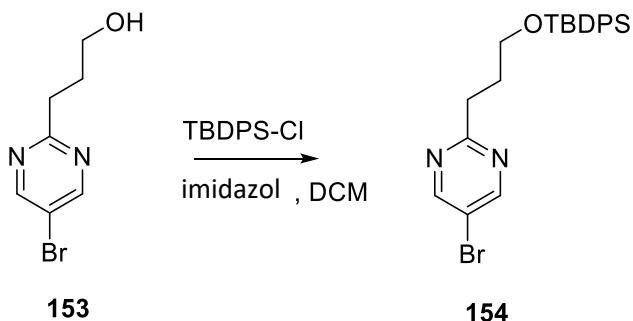
13-azahexadecan-16-il)pirimidin-5-il)-9-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)nonanoico)



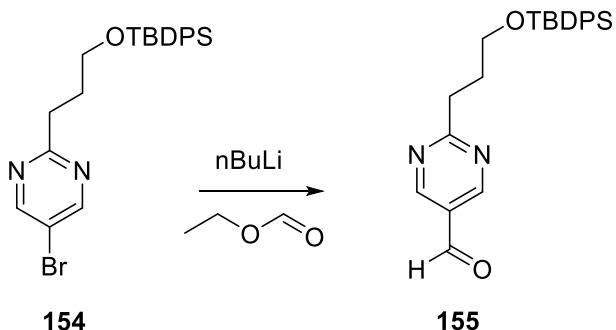
[0337] Foi adicionada uma solução de *i*-PrMgBr em THF (0,75 M, 56 mL, 42,0 mmol) a uma solução de 5-bromo-2-iodo-pirimidina (8,00 g, 28,1 mmol) em THF anidro (95 mL) a -78 °C enquanto era mantida uma temperatura interna <-70 °C (ca. 15 M). A solução resultante foi então agitada por 15 minutos antes de adicionar solução CuCN•2LiCl em THF (1 M, 31 mL, 31,0 mmol) e, em seguida, brometo de alil (5,10 g, 42 mmol) como uma solução em THF (10 mL). A mistura de reação foi aquecida em temperatura ambiente e agitada durante 1 h. A mistura de reação foi extinta com MeOH (40 mL) e concentrada. O resíduo foi purificado por CombiFlash usando sílica gel como fase estacionária e eluído com um gradiente de EtOAc em hexanos (0-20%). Rendimento do composto 152: 4,13 g (74%). Massa calculada para C₇H₇ BrN₂ [M+H]⁺: 198,99, encontrado: 199,05.



[0338] Foi adicionado uma solução de 9-BBN em THF (0,5 M, 131 mL, 65,8 mmol) a 0 °C a uma solução do composto 152 (7,70 g, 38,7 mmol) em THF (115 mL) ao longo de 30 M. A mistura de reação foi aquecida em temperatura ambiente e agitada durante a noite. Foi adicionada uma pasta de NaHCO₃ (48,7 g, 580 mmol) em água (100 mL) à mistura de reação, seguida por uma pasta de NaBO₃ mono-hidratada (46,3 g, 464 mmol) em água (100 mL) a 0 °C. O banho de arrefecimento foi removido e a mistura foi agitada vigorosamente durante 1 h. A mistura de reação foi transferida para um funil de separação e as camadas foram separadas. A camada aquosa foi extraída com EtOAc (200 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com salmoura (100 mL). A camada de salmoura foi extraída de novo com EtOAc (100 mL). A fase orgânica combinada foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada e concentrada, e concentrada para render ~15 g de óleo amarelo bruto. O bruto foi purificado por CombiFlash usando sílica gel como fase estacionária e eluído com um gradiente de EtOAc em hexanos (50–100%). Rendimento do composto 153: 3,44 g (41%). Massa calculada para C₇H₉BrN₂O [M+H]⁺: 217,00, encontrado: 216,97.

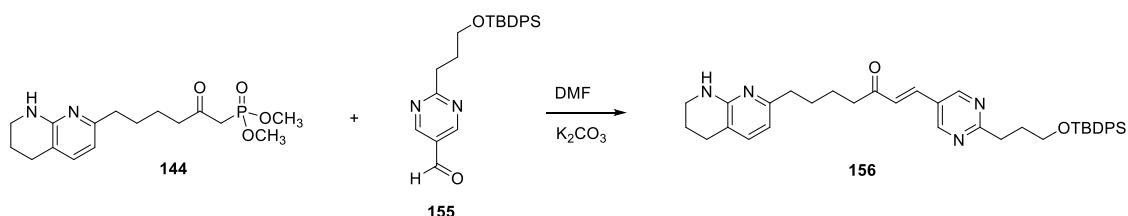


[0339] Foi adicionado imidazol (1,73 g, 25,4 mmol) e uma solução de TBDPSCl (5,23 g, 19,0 mmol) em DCM (12 mL) a 0 °C a uma solução do composto 153 (3,44 g, 15,8 mmol) em DCM (40 mL). A reação foi aquecida em temperatura ambiente e agitada durante a noite. A mistura de reação foi diluída com DCM (75 mL) e lavada com água (50 mL) e salmoura (50 mL). A camada orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por CombiFlash usando sílica gel como fase estacionária e eluído com um gradiente de EtOAc (0–8%) em hexanos. Rendimento do composto 154: 5,56 g (77%). Massa calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{OSi}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 455,12, encontrado: 455,44.



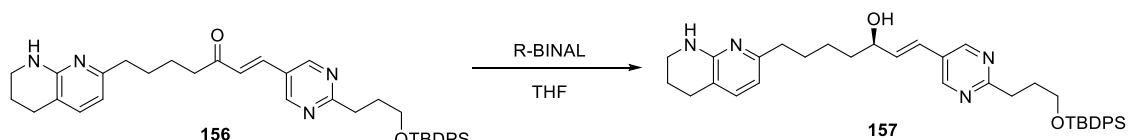
[0340] Foi adicionada uma solução de nBuLi em THF (2,5 M, 5,6 mL, 14,0 mmol) gota a gota a uma solução do composto 154 (6,07 g, 13,3 mmol) em THF (150 mL) a -75 °C, mantendo uma

temperatura interna <- 70 °C (ca. 10 M). Após 3 M, uma solução de formato de etil (1,04 g, 1,13 mL, 14,0 mmol) em THF (5 mL) foi adicionada gota a gota, mantendo uma temperatura interna <-70 °C. A mistura foi agitada a -78 °C durante 20 M, em seguida extinta com HCl em dioxano (4 M, 3,67 mL, 14,7 mmol) que foi posteriormente diluído com THF (5 mL), mantendo uma temperatura interna <-65 °C. O banho de resfriamento foi removido e a reação foi aquecida em temperatura ambiente e concentrada. O resíduo foi purificado por CombiFlash usando sílica gel como fase estacionária e eluído com um gradiente de EtOAc em hexanos (0-20%). Rendimento do composto 155: 1,79 g (33%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 10,09 (s, 1H), 9,06 (s, 2H), 7,64 (m, 4H), 7,38 (m, 6H), 3,77 (t, 2H), 3,20 (t, 2H), 2,17 (q, 2H), 1,03 (s, 9H).



[0341] Foi adicionado K_2CO_3 (0,861 g, 6,23 mmol) a uma solução do composto 144 (1,68 g, 4,15 mmol) e composto 155 (1,70 g, 4,98 mmol) em THF (25 mL). A mistura de reação foi aquecida a 40 °C durante 2,5 horas e depois a 50 °C durante 12 horas. A mistura de reação foi diluída com EtOAc (100 mL) e lavada com água (50 mL) e salmoura (50 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por CombiFlash usando sílica gel como fase

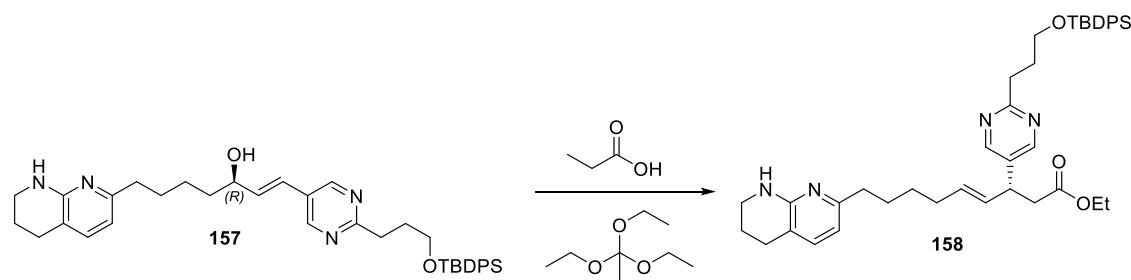
estacionária e eluído com um gradiente de EtOAc (0-100%) em hexanos contendo 1% de trietilamina. Rendimento do composto 156: 2,04 g (79%). Massa calculada para $C_{38}H_{46}N_4O_2Si$ $[M+H]^+$: 619,35, encontrado: 619,69.



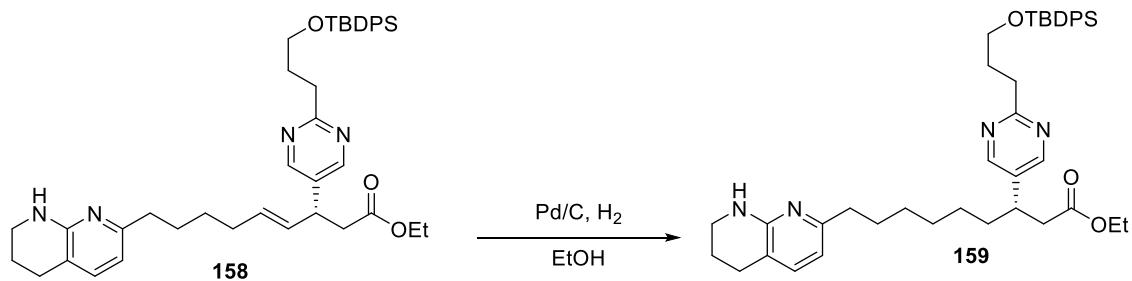
[0342] Preparação de R-BINAL: LAH (1,169 g, 30,8 mmol) foi suspenso em THF seco (90 mL). Foi adicionado EtOH à pasta como uma solução em THF (6 M, 5,2 mL, 31,4 mmol), mantendo $T_{int} < 40$ °C. A mistura foi envelhecida a 35 °C durante 40 minutos e depois resfriada a 30 °C. Uma solução de R- (BINOL) (9,00 g, 31,4 mmol) em THF (45 mL) foi adicionada, mantendo $T_{int} < 40$ °C. A mistura foi envelhecida a 50 °C durante 1 h, resfriada em temperatura ambiente, depois aquecida a 50 °C e foi adicionado TMEDA (14,1 mL, 11,0 g, 94,3 mmol). A mistura foi envelhecida a 50 °C durante 1 h, resfriada em temperatura ambiente e, em seguida, usada com o composto 156.

[0343] Foi adicionado uma solução do composto 16 (1,16 g, 1,88 mmol) em THF (12 mL) a -78 °C a uma solução de R-BINAL (~ 0,2 M, 110 mL, 22,0 mmol) em THF ao longo de 5 M. Após 30 M, a mistura de reação foi extinta com NH₄Cl sat. aq., aquecido por rt, e o produto foi extraído com EtOAc (3 x 125 mL). A camada orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por

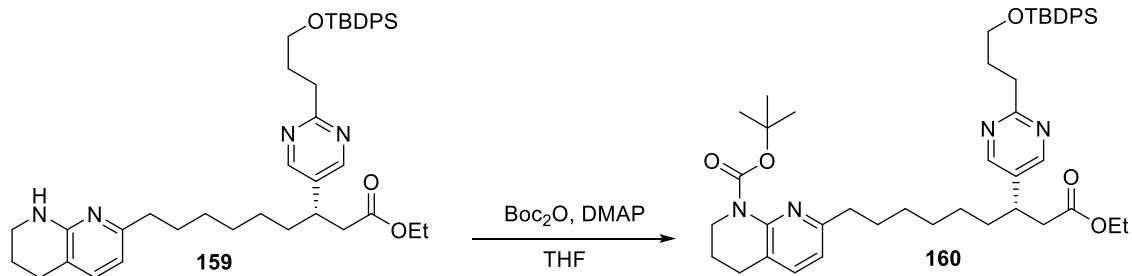
CombiFlash usando sílica gel como fase estacionária e eluído com um gradiente de MeOH (0-5%) em EtOAc contendo 1% de trietilamina. Rendimento do composto 157: 0,96 g (82%). A pureza quiral foi determinada por HPLC quiral analítica, coluna Chiraldpak AD-H 4,6 x 250 mm, 5 microns, 25% de EtOH, 75% de hexanos, 0,1% de dietilamina isocrática, 2 mL/min.). O segundo isômero R a eluir tinha ~95% de área pura, correspondendo a ~90% ee. Massa calculada para C₃₈H₄₈N₄O₂Si [M+H]⁺: 621,36, encontrado: 621,71.



[0344] Foi adicionado uma solução de ácido propiônico em trimetilortoacetato (0,15 M, 0,55 mL, 0,08 mmol) a uma solução do composto 157 (0,925 g, 1,49 mmol) em trietilortoacetato (9,25 mL). A mistura de reação foi aquecida a 140 °C num frasco selado durante 1,5 h. A mistura de reação foi concentrada e o resíduo foi purificado por CombiFlash usando sílica gel como fase estacionária, eluindo com um gradiente de EtOAc (0-50%) em hexanos contendo 1% de trietilamina. Rendimento do composto 158: 0,898 g (87%). Massa calculada para C₄₂H₅₄N₄O₃Si [M+H]⁺: 691,41, encontrado: 691,93.

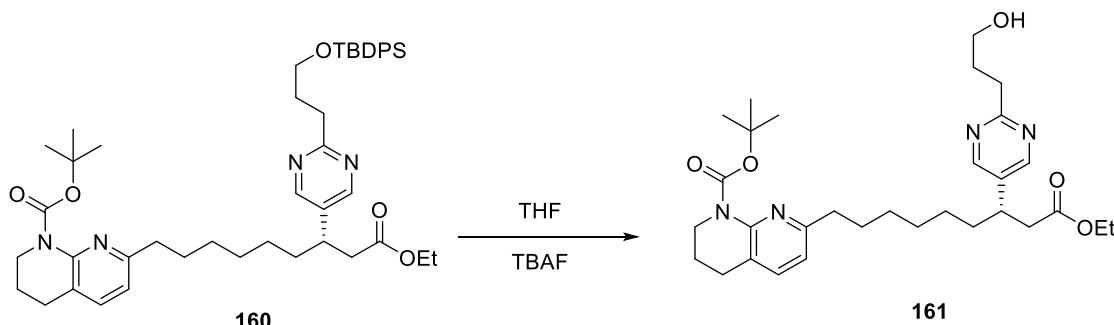


[0345] Foi adicionado uma pasta de Pd/C a uma solução do composto 158 (0,893 g, 1,30 mmol) em EtOH (10 mL) (extensão do carregamento: 10 peso%, 0,138 g, 0,13 mmol) em EtOH (4 mL). A mistura de reação foi carregada com 50 psi de H₂ e agitada durante 4,5 h. A mistura de reação foi filtrada, concentrada e usada na próxima etapa sem purificação adicional. Rendimento do composto 159: 0,885 g (99%). Massa calculada para C₄₂H₅₆N₄O₃Si [M+H]⁺: 693,42, encontrado: 693,82.



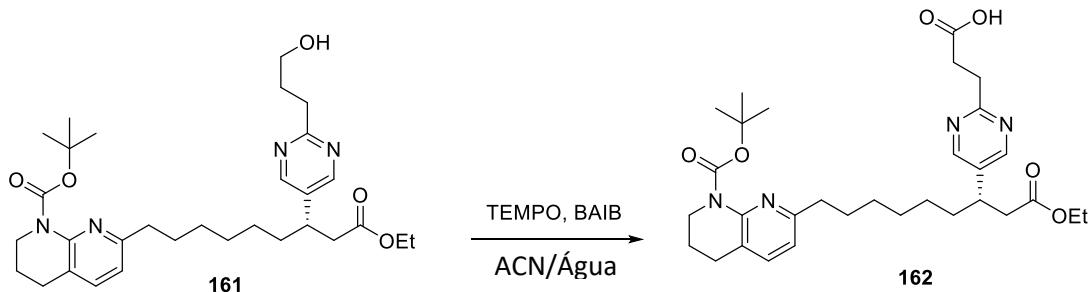
[0346] Uma solução de anidrido Boc (0,836 g, 3,83 mmol) em THF (2,5 mL) foi adicionada ao composto 159 (0,885 g, 1,28 mmol) seguido por uma solução de DMAP (20 mg/mL em THF, 155 uL, 0,0031 g, 0,026 mmol). A mistura foi aquecida a 60 °C durante 6 h. A mistura de reação foi concentrada e o resíduo foi purificado por CombiFlash usando sílica gel como fase estacionária, eluindo com um gradiente de EtOAc (0-50%)

em hexanos. Rendimento do composto 160: 0,721 g (71%). Massa calculada para C₄₇H₆₄N₄O₅Si [M+H]⁺: 793,47, encontrado: 794,28.

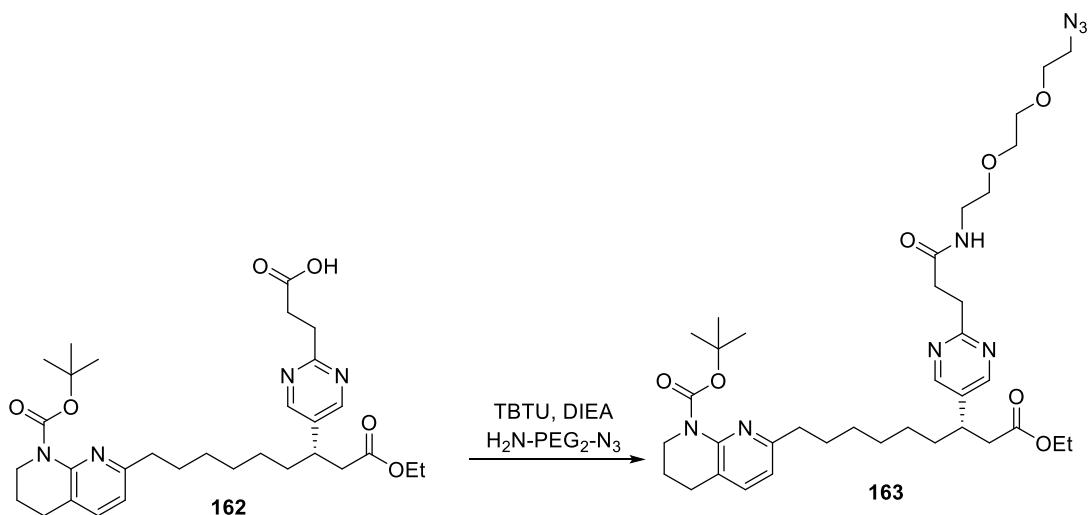


[0347] A uma solução do composto 160 (0,621 g, 0,783 mmol) em THF (6 mL) foi adicionada uma solução de TBAF em THF (1 M, 1,2 mL, 1,2 mmol) a 0 °C. A mistura de reação foi aquecida em temperatura ambiente e agitada durante 2 h. A mistura de reação foi diluída com EtOAc (30 mL) e lavada com solução sat. Aq. NH₄Cl (2 x 10 mL). A camada orgânica foi concentrada. O resíduo foi purificado por CombiFlash usando sílica gel como fase estacionária e eluído com um gradiente de EtOAc (50–100%) em hexanos. Rendimento do composto 21: 0,362 g (83%). A pureza quiral foi determinada por HPLC quiral analítico, coluna Chiraldpak AD-H 4,6 x 250 mm, 5 microns, 20% EtOH. 80% hexanos, 0,1% dietilamina isocrática, 1,5 mL/min. O segundo isômero de eluição R era 93% puro, correspondendo a 86% ee. O composto 161 foi ainda purificado por HPLC quiral semipreparativa (Chiraldpak AD-H 21,2 x 250 mm, 5 microns, 20% de EtOH, 80% de hexanos, 0,1% de dietilamina, 60 mL/min). Rendimento

final do composto 161: 308 mg (99% ee). Massa calculada para $C_{31}H_{46}N_4O_5$ $[M+H]^+$: 555,36, encontrado: 555,72.

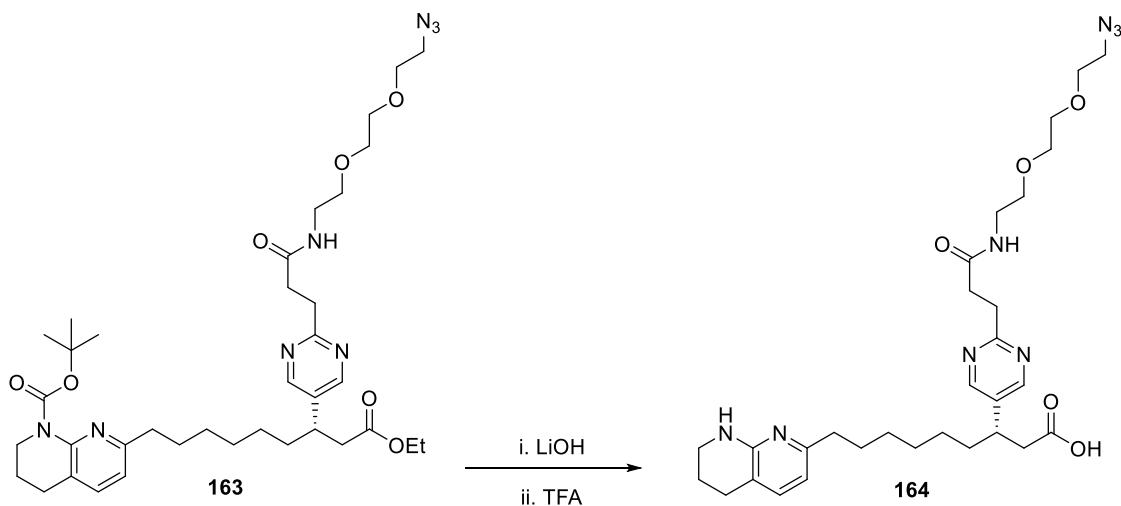


[0348] Foi adicionado BAIB (0,042 g, 0,130 mmol) e TEMPO (2,5 mg, 0,016 mmol) a uma solução do composto 161 (0,030 g, 0,054 mmol) em ACN (0,30 mL), seguido por água (0,30 mL) em temperatura ambiente. Após 2 horas, a mistura de reação foi concentrada. O resíduo foi purificado por RP-HPLC (Phenomenex Gemini C18 21,2 x 250 mm, 5 microns, 0,1% de TFA água/ACN, gradiente de 30–80% de ACN). Rendimento do composto 162: 0,030 g (97%). Massa calculada para $C_{31}H_{44}N_4O_6$ $[M+H]^+$: 569,34, encontrado: 569,68.



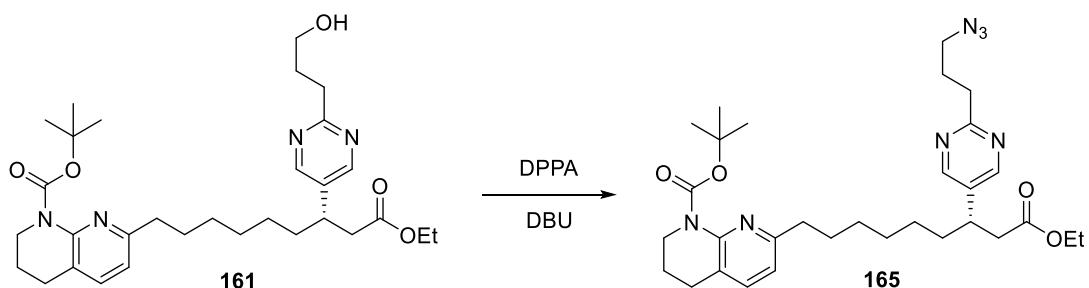
[0349] Foi adicionado TBTU (32 mg, 0,099 mmol) a uma solução do composto 162 (33 mg, 0,058 mmol) e amino-PEG₂-

azida (15 mg, 0,087 mmol) em DMF (0,5 mL), em seguida DIEA (35 μ L, 26 mg, 0,203 mmol) a 0 °C. A mistura de reação foi aquecida em temperatura ambiente e agitada durante 30 minutos. A mistura de reação foi concentrada e o produto, o composto 163, foi utilizado no passo seguinte sem purificação. Massa calculada para $C_{37}H_{56}N_8O_7$ [M+H] $^+$: 725,44, encontrado: 725,77.

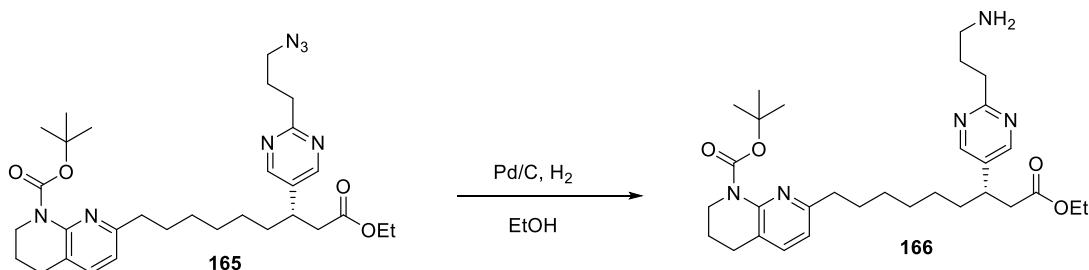


[0350] Foi adicionada a uma solução do composto 163 (42 mg, 0,058 mmol) em THF (0,30 mL) uma solução 1 M de LiOH (0,174 mL, 0,174 mmol). A mistura de reação foi aquecida a 40 °C durante 1 hr. Uma porção adicional de LiOH foi adicionada (0,174 mL, 0,174 mmol). Após 3 h, a reação parou e uma porção adicional de LiOH foi adicionada (0,174 mL, 0,174 mmol). A reação foi agitada por mais 2 h (9 eq LiOH, 5 h no total). A mistura de reação foi neutralizada a pH=5 usando HCl 3 N e concentrada. O resíduo foi dissolvido em TFA:água [95:5] e agitado durante 2 horas em temperatura ambiente. A mistura de reação foi concentrada e o resíduo

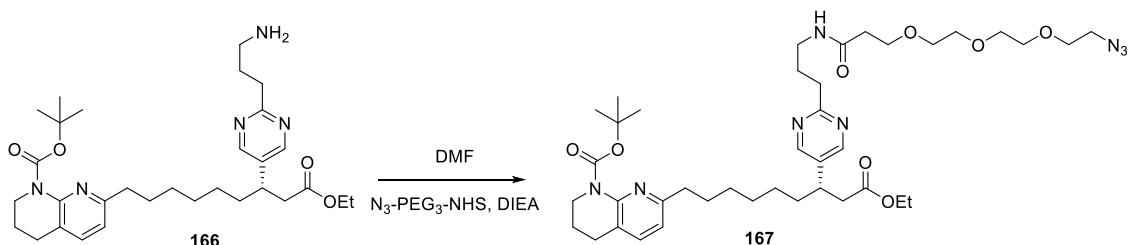
foi purificado por RP-HPLC (Phenomenex Gemini C18 21,2 x 250 mm, 5 microns, agua/ACN contendo 0,1% de TFA, 20-50% de gradiente de ACN). Rendimento do composto 164 (Estrutura 38c) : 23 mg (66%). Massa calculada para C₃₀H₄₄N₈O₅ [M+H]⁺: 597,35, encontrado: 597,85.



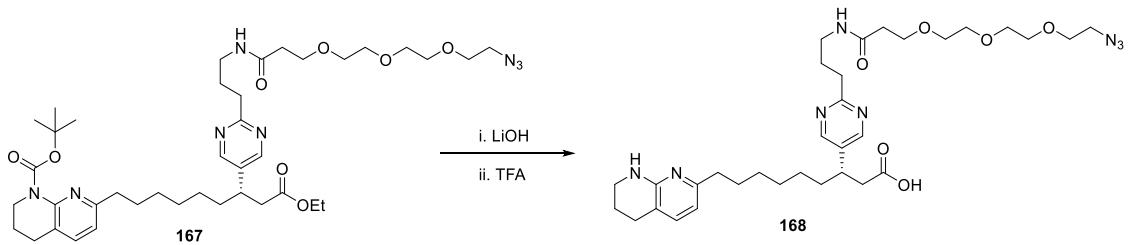
[0351] Foi adicionada difenil fosforil azida (35 μ L, 45 mg, 0,162 mmol) a uma solução do composto 161 (30 mg, 0,054 mmol) em THF (150 μ L), seguida por DBU (12 μ L, 12 mg, 0,081 mmol) a 0 °C. A mistura de reação foi aquecida em temperatura ambiente e agitada durante a noite. Na manhã seguinte, a mistura de reação foi aquecida a 60 °C durante 7 h. A mistura de reação foi concentrada e purificada por RP-HPLC (Phenomenex Gemini C18 21,2 x 250 mm, 5 micrones, 0,1% de TFA água/ACN, gradiente de 32-60% ACN). Rendimento do composto 165: 14 mg (44%). Massa calculada para $C_{31}H_{45}N_7O_4$



[0352] A uma solução do composto 165 (18 mg, 0,031 mmol) em EtOH (100 µL) foi adicionada uma pasta de Pd/C (10% de carga, 3,3 mg, 0,003 mmol) em EtOH (170 µL). O recipiente de reação foi carregado com H₂, em seguida evacuado três vezes e, em seguida, carregado com H₂ (1 atm). Após 30 minutos, a mistura de reação foi filtrada, concentrada e usada na etapa seguinte sem purificação adicional. Rendimento do composto 166: 17 mg (99%). Massa calculada para C₃₁H₄₇N₅O₄ [M+H]⁺: 554,37, encontrado: 554,73.



[0353] Foi adicionado DIEA (16 µL, 12 mg, 0,092 mmol) em temperatura ambiente a uma solução do composto 166 (17 mg, 0,031 mmol) e éster de azida-PEG₃-NHS (14 mg, 0,040 mmol) em DMF (170 µL). A mistura de reação foi agitada durante 1 h em temperatura ambiente, concentrada e, em seguida, utilizada no passo seguinte sem purificação. Massa calculada para C₄₀H₆₂N₈O₈ [M+H]⁺: 783,48, encontrado: 783,84.



[0354] Foi adicionada a uma solução do composto 167 (24 mg, 0,031 mmol) em THF (180 µL) uma solução 1 M de LiOH (153 µL, 0,153 mmol). A mistura de reação foi aquecida a 40 °C. Após 1 hora, uma porção adicional de LiOH foi adicionada (153 uL, 0,153 mmol, 5 eq). A mistura de reação foi agitada durante 3 h a 40 °C e depois em temperatura ambiente durante a noite. A mistura de reação foi neutralizada a pH=5 usando HCl 3 N e concentrada. O resíduo foi dissolvido em TFA:água [95:5] e agitado durante 3 horas em temperatura ambiente. A mistura de reação foi concentrada e o resíduo foi purificado por RP-HPLC (Phenomenex Gemini C18 21,2 x 250 mm, 5 microns, água/ACN contendo 0,1% de TFA, 15-45% de gradiente de ACN). Rendimento do composto 168 (**Estrutura 39c**): 9,8 mg (49%). Massa calculada para $C_{33}H_{50}N_8O_6$ $[M+H]^+$: 655,40, encontrado: 656,01.

Exemplo 2. Síntese de ligantes dirigidos à integrina tridentados, agentes de RNAi e conjugação de ligantes dirigidos à integrina com moléculas de carga (agentes de RNAi).

[0355] Os ligantes dirigidos à integrina podem ser conjugados com um ou mais agentes de RNAi úteis para inibir a expressão de um ou mais genes-alvo em células que expressam integrinas. Os ligantes dirigidos à integrina divulgados aqui facilitam a distribuição dos agentes de RNAi às células e/ou tecidos direcionados. O Exemplo 1 acima descreveu a síntese de certos ligantes dirigidos à integrina divulgados

aqui. A seguir, a descrição dos procedimentos gerais para a síntese de certos conjugados ligante-agente de RNAi de direcionamento de integrina que são ilustrados nos Exemplos não limitativos aqui apresentados.

[0356] A. *Síntese dos agentes de RNAi.* Os agentes de RNAi podem ser sintetizados usando métodos geralmente conhecidos na técnica. Para a síntese dos agentes de RNAi ilustrados nos Exemplos aqui apresentados, as cadeias de sentido e antissentido dos agentes de RNAi foram sintetizadas de acordo com a tecnologia de fosforamidita em fase sólida usada na síntese de oligonucleotídios. Dependendo da escala, foram usados um MerMade96E® (Bioautomation), um MerMade12® (Bioautomation) ou um OP Pilot 100 (GE Healthcare). As sínteses foram realizadas sobre um suporte sólido feito de vidro poroso controlado (CPG, 500 Å ou 600Å, obtido da Prime Synthesis, Aston, PA, EUA). Todos os fosforamiditos de RNA e RNA modificado em 2' foram adquiridos na Thermo Fisher Scientific (Milwaukee, WI, EUA). Especificamente, os seguintes 2'-O-metil fosforamiditos foram usados: (5'-O-dimetoxitritil-N⁶-(benzoil)-2'-O-metil-adenosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino) fosforamidita, 5'-O-dimetoxytritil-N⁴-(acetil)-2'-O-metil-citidina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropil-amino) fosforamidita, (5'-O-dimetoxitritil-N²-(isobutiril)-2'-O-metil-guanosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino) fosforamidita e 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-metiluridina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-

diisopropilamino) fosforamidita. Os 2'-desoxi-2'-fluoro-fosforamiditos transportavam os mesmos grupos de proteção que os 2'-O-metil RNA amiditos. Os fosforamiditos de 5'-dimetoxitritil-2'-O-metil-inosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino) foram adquiridos em Glen Research (Virginia). Os fosforamiditos abásicos invertidos de (3'-O-dimetoxitritil-2'-desoxirribose-5'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino) foram adquiridos na ChemGenes (Wilmington, MA, EUA). Os seguintes fosforamiditos UNA foram usados: 5'-(4,4'-Dimetoxitritil)-N6-(benzoil)-2',3'-seco-adenosina, 2'-benzoil-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita, 5'(4,4'Dimetoxitritil)-N-acetil-2',3'-seco-citosina, 2'-benzoil-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diiso-propil)]-fosforamidita, 5'-(4,4'-Dimetoxitritil)-N-isobutiril-2',3'-seco-guanosina, 2'-benzoil-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita e 5'-(4,4'-Dimetoxi-tritil)-2',3'-seco-uridina, 2'-benzoil-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diiso-propil)]-fosforamidita. Os fosforamiditos de aminolink TFA também foram adquiridos comercialmente (ThermoFisher).

[0357] Em alguns exemplos, os ligantes dirigidos à integrina divulgados neste documento são conjugados aos agentes de RNAi ligando os componentes a um arcabouço que inclui um grupo tri-alcino, ou a um nucleotídeo modificado compreendendo um grupo propargil como mostrado na Tabela B, acima. Em alguns exemplos, o grupo tri-alcino é adicionado usando uma fosforamidita contendo tri-alcino, que pode ser

adicionada na extremidade 5' terminal do filamento em sentido de um agente de RNAi. Quando usados em conexão com os agentes de RNAi apresentados em certos exemplos aqui, fosforamiditos contendo tri-alcino foram dissolvidos em diclorometano anidro ou acetonitrila anidro (50 mM), enquanto todas as outras amiditas foram dissolvidas em acetonitrila anidra (50 mM) e foram adicionadas peneiras moleculares (3Å). Foram usados como solução ativadora 5-Benziltio-1H-tetrazol (BTT, 250 mM em acetonitrila) ou 5-Etiltio-1H-tetrazol (ETT, 250 mM em acetonitrila). Os tempos de acoplamento foram de 10 minutos (RNA), 90 segundos (2' O-Me) e 60 segundos (2' F). A fim de introduzir ligações de fosforotioato, foi utilizada uma solução 100 mM de 3-fenil 1,2,4-ditiazolina-5-ona (POS, obtido de PolyOrg, Inc., Leominster, MA, EUA) em acetonitrila anidro.

[0358] Alternativamente, onde os ligantes dirigidos à integrina são conjugados aos agentes de RNAi por meio de um andaime tri-alcino, em vez de usar uma abordagem de fosforamidita, os compostos contendo tri-alcino podem ser introduzidos pós-sinteticamente (consulte, por exemplo, a seção E abaixo). Quando usado em conexão com os agentes de RNAi apresentados em certos exemplos aqui estabelecidos, ao anexar um grupo tri-alcino pós-sinteticamente à extremidade 5' do filamento de sentido, o nucleotídeo terminal 5' do filamento de sentido foi funcionalizado com um nucleotídeo que incluiu uma amina primária na extremidade 5' para

facilitar a fixação ao andaime contendo tri-alcino. A fosforamidita do aminolink de TFA foi dissolvida em acetonitrila anidro (50 mM) e foram adicionadas peneiras moleculares (3 Å). Foram usados como solução ativadora 5-Benziltio-1H-tetrazol (BTT, 250 mM em acetonitrila) ou 5-Etiltio-1H-tetrazol (ETT, 250 mM em acetonitrila). Os tempos de acoplamento foram de 10 minutos (RNA), 90 segundos (2' O-Me) e 60 segundos (2' F). A fim de introduzir ligações de fosforotioato, foi utilizada uma solução 100 mM de 3-fenil 1,2,4-ditiazolina-5-ona (POS, obtido de PolyOrg, Inc., Leominster, MA, EUA) em acetonitrila anidro.

[0359] Nos exemplos aqui estabelecidos, o seguinte mostra a sequência de nucleotídeos modificada para os duplexes sintetizados:

Duplex AD04545:

Sequência modificada de filamento antissentido (5' → 3):

usUfsusCfaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfuUfsg (SEQ ID NO: 1)

Sequência modificada de filamento de sentido (5' → 3): (NH₂-C₆)scsaacguaaCfGfAfuuucaugaasa(invAb) (SEQ ID NO: 2)

Duplex AD04546:

Sequência modificada de filamento antissentido (5' → 3):

usUfsusCfaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfuUfsg (SEQ ID NO: 3)

Sequência modificada de filamento de sentido (5' → 3):

(NH₂-

C₆)scsaacguaaCfGfAfuuucaugaasa(invAb)(C₆-S-Mal-X) (SEQ ID NO: 4)

Duplex AD05971:

Sequência modificada de filamento antissentido (5' → 3'):

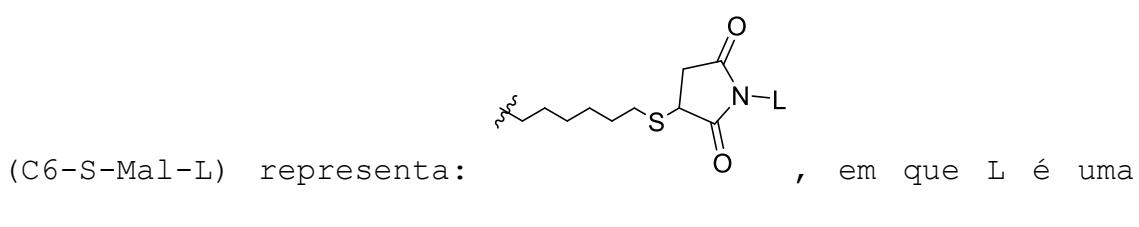
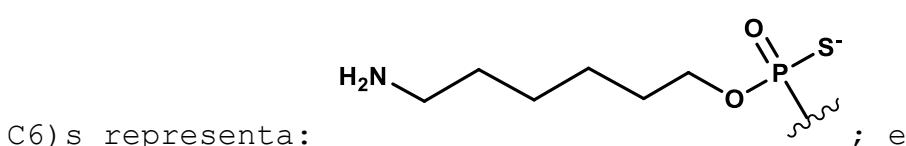
usUfsusCfaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfuUfsg (SEQ ID NO: 5)

Sequência modificada de filamento de sentido (5' → 3'):

(NH2-

C6) scsaacguaaCfGfAfuuuAlkcaAlkugAlkaaAlksa (invAb) (C6-S-Mal-C18 parte diácido) (SEQ ID NO: 6)

Para as sequências de nucleotídeos modificadas listadas acima, a, c, g e u representam 2'-O-metil adenosina, citidina, guanosina ou uridina, respectivamente; Af, Cf, Gf e Uf representam 2'-fluoro adenosina, citidina, guanosina ou uridina, respectivamente; aAlk, cAlk, gAlk e uAlk representam 2'-O-propargil adenosina, citidina, guanosina ou uridina, respectivamente; (invAb) representa um resíduo abásico invertido (desoxirribonucleotídeo abásico invertido); s representa uma ligação de fosforotioato; (NH2-



Para as modalidades aqui, ao visualizar o respectivo filamento 5' → 3', os abásicos invertidos são inseridos de

modo que a posição 3' da desoxirribose seja ligada na extremidade 3' do monômero anterior no respectivo filamento.

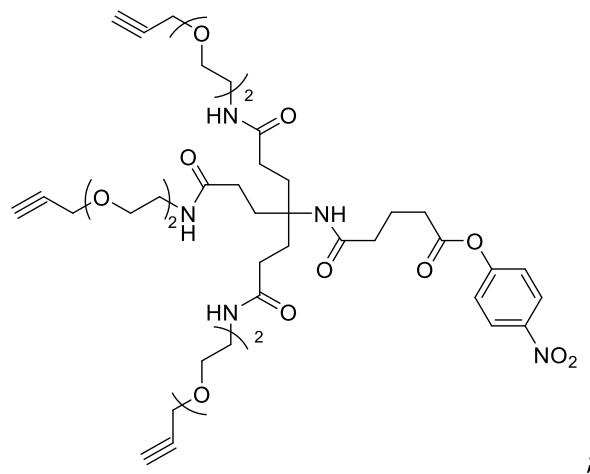
[0360] *B. Clivagem e desproteção do oligômero ligado ao suporte.* Após a finalização da síntese em fase sólida, o suporte sólido seco foi tratado com uma solução em volume 1:1 de 40% em peso % metilamina em água e 28% a 31% de solução de hidróxido de amônio (Aldrich) por 1,5 hora a 30 °C. A solução foi evaporada e o resíduo sólido foi reconstituído em água (consulte abaixo).

[0361] *C. Purificação.* Os oligômeros brutos foram purificados por HPLC de troca aniônica, usando uma coluna TSKgel SuperQ-5PW de 13 µm e sistema Shimadzu LC-8. O tampão A era Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 9,0 e continha 20% de acetonitrilo e o tampão B era igual ao tampão A, com a adição de cloreto de sódio 1,5 M. Foram registrados traços de UV em 260 nm. As frações apropriadas foram reunidas e depois executadas em HPLC de exclusão de tamanho usando uma coluna GE Healthcare XK 16/40 empacotada com Sephadex G25 fino com um tampão de corrida de bicarbonato de amônio 100 mm, pH 6,7 e 20% de acetonitrila ou água filtrada.

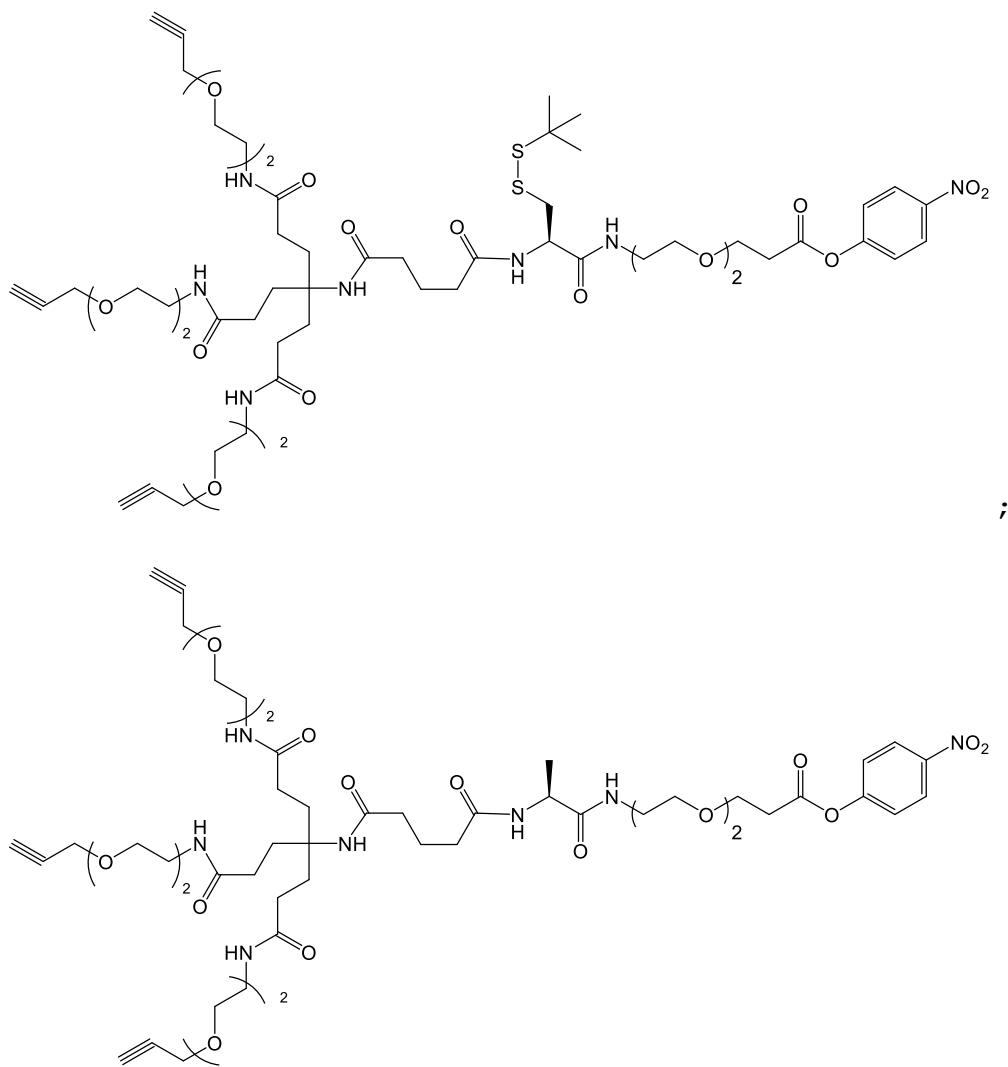
[0362] *D. Recozimento.* As fitas complementares foram misturadas combinando soluções de RNA equimolares (de sentido e antissenso) em 1× PBS (solução salina tamponada com fosfato, 1×, Corning, Cellgro) para formar os agentes de RNAi. Alguns agentes de RNAi foram liofilizados e armazenados entre -15 e -25 °C. A concentração duplex foi determinada

medindo a absorbância da solução em um espectrômetro UV-VIS em 1× PBS. A absorbância da solução a 260 nm foi então multiplicada por um fator de conversão e o fator de diluição para determinar a concentração do duplex. O fator de conversão usado foi 0,037 mg/(mL·cm) ou, alternativamente, para alguns experimentos, um fator de conversão foi calculado a partir de um coeficiente de extinção determinado experimentalmente.

[0363] E. Conjugação de andaime tri-alcino. Antes ou após o recozimento, a cadeia de sentido funcionalizada com amina 5' ou 3' de um agente de RNAi pode ser conjugada a um andaime tri-alcino. Estruturas de andaime tri-alcino de exemplo que podem ser usadas na formação dos construtos divulgados aqui incluem o seguinte:



;



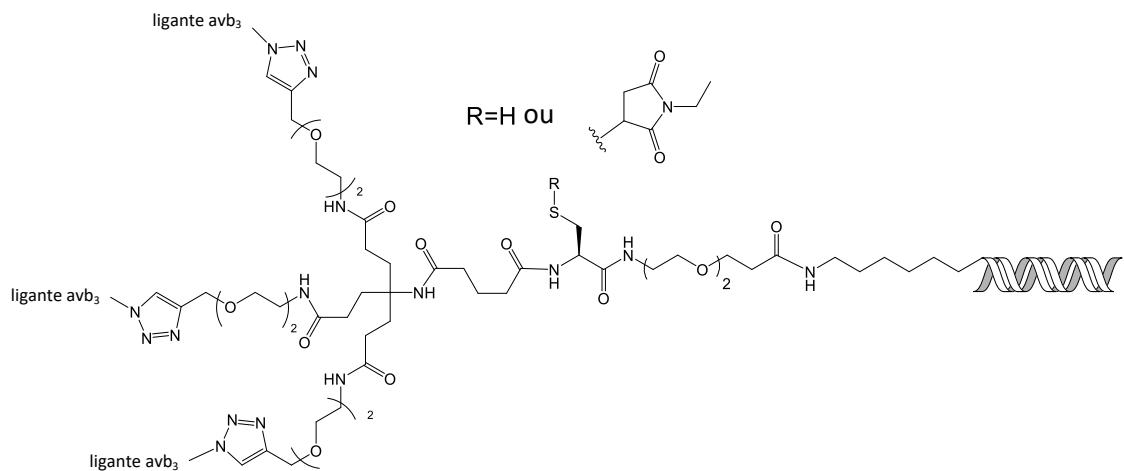
[0364] O seguinte descreve a conjugação do andaime tri-alcino ao duplex reconzido: O duplex funcionalizado com amina foi dissolvido em 90% DMSO/10% H₂O, em ~50-70 mg/mL. Adicionou-se 40 eq de trietilamina, seguido por 3 eq de tri-alcino-PNP. Uma vez completo, o conjugado foi precipitado duas vezes em um sistema solvente de 1x solução salina tamponada com fosfato/acetonitrila (proporção de 1:14) e seco.

[0365] F. Conjugação de ligantes dirigidos à integrina.
Antes ou após o emparelhamento, a cadeia de sentido

funcionalizada do alcino tridentado 5' ou 3' é conjugada com os ligantes dirigidos à integrina. O exemplo a seguir descreve a conjugação de ligantes dirigidos à integrina $\alpha v \beta 3/5$ ao duplex recozido: as soluções padrão de 0,5 M de Tris (3-hidroxipropiltriazolilmetil) amina (THPTA), 0,5 M de Cu (II) sulfato penta-hidratado ($Cu^{(II)} SO_4 \cdot 5 H_2O$) e a solução 2 M de ascorbato de sódio foram preparadas em água deionizada. Foi feita uma solução de 75 mg/mL em DMSO de ligante dirigido à integrina. São adicionados 25 μL de tampão Hepes 1M pH 8,5 em um tubo de centrífuga de 1,5 mL contendo duplex funcionalizado tri-alcino (3 mg, 75 μL , 40 mg/mL em água deionizada, ~ 15.000 g/mol). Após agitação no vórtex, foram adicionados 35 μL de DMSO e a solução foi agitada no vórtex. O ligante dirigido à integrina foi adicionado à reação (6 eq/duplex, 2 eq/alcino, ~15 μL) e a solução foi submetida a vórtice. Usando papel de pH, o pH foi verificado e confirmado como pH ~8. Em um tubo de centrífuga de 1,5 mL separado, 50 μL de THPTA 0,5 M foram misturados com 10 μL de $Cu^{(II)} SO_4 \cdot 5 H_2O$ 0,5 M, agitados em vórtex e incubados em temperatura ambiente por 5 min. Após 5 min., foi adicionada solução de THPTA/Cu (7,2 μL , 6 eq 5:1 THPTA:Cu) ao frasco de reação e agitada em vórtice. Imediatamente depois, foi adicionado ascorbato 2M (5 μL , 50 eq por duplex, 16,7 por alcino) ao frasco de reação e agitado em vórtex. Uma vez que a reação estava completa (tipicamente completa em 0,5-1h),

a reação foi imediatamente purificada por cromatografia de troca aniônica não desnaturante.

[0366] G. Funcionalização do grupo tiol no ligante de cisteína. Em algumas modalidades, um ligante de cisteína pode ser usado para facilitar a conjugação dos ligantes dirigidos à integrina ao agente de RNAi. Antes ou após o reconhecimento, a cadeia de sentido funcionalizado 5' ou 3' tridentado alcino-Cis(Stbu)-PEG₂ é funcionalizada com uma parte contendo maleimida, ou pode ser reduzida e deixada como o tiol livre, como mostrado na seguinte estrutura:



[0367] O exemplo a seguir descreve a modificação do tri-alcino-Cis(Stbu)-PEG₂-duplex com N-etil maleimida: O tri-alcino-Cis(Stbu)-PEG₂-duplex (35 mg) foi dissolvido em 500 µL de H₂O deionizada. Foi adicionado tampão HEPES (1M, pH 8,5, 82 µL) à reação e a solução foi agitada com vórtice. Uma solução de 1 M de Ditiotreitol (DTT, 100 eq, 236 µL) foi adicionada e a solução foi colocada em um agitador de vórtice por 3 h. Após a confirmação da redução do dissulfeto por desnaturação RP-HPLC, o conjugado foi precipitado três vezes

em um sistema solvente de 1x solução salina tamponada com fosfato/acetonitrila (proporção 1:14). O sedimento precipitado foi reconstituído em 0,5 mL de HEPES 0,1 M, pH 6,5 e N-etil maleimida (3 mg, 10 eq) foi adicionado à solução e colocado em um misturador de vórtice por ~15 min. Após a conclusão da reação, o conjugado foi precipitado três vezes em um sistema de solventes de 1x solução salina tamponada com fosfato/acetonitrila (proporção de 1:14), dessalinizado e seco.

Exemplo 3. Atividade de ligação de ligantes dirigidos à integrina.

[0368] Conforme relatado na Tabela 1 a seguir, os dados de ligação de IC50 foram obtidos para os ligantes dirigidos à integrina das Estruturas 1c, 2c e 3c, bem como um peptídeo mimético de RGD:

Tabela 1. Atividade de ligação IC50.

Grupo	IC50 (nM)		
	$\alpha v\beta 3$	$\alpha v\beta 5$	$\alpha v\beta 6$
Estrutura 1c	0,3	0,6	5,3
Estrutura 2c	0,3	5,6	8,9
Estrutura 3c	0,8	1,8	81
Peptídeo mimético de RGD	1,6	2,5	81

[0369] Conforme mostrado na Tabela 1, acima, as Estruturas 1, 2 e 3 mostraram, cada uma, ligação potente à integrina $\alpha v\beta 3$ e integrina $\alpha v\beta 5$, com as Estruturas 2 e 3, por exemplo, mostrando uma preferência particular para a ligação à integrina $\alpha v\beta 3$ ($IC_{50} = 0,3$ nM e $0,8$ nM, respectivamente). Além disso, cada uma das Estruturas 1, 2 e 3, mostrou uma atividade de ligação ligeiramente aumentada à integrina $\alpha v\beta 3$ em comparação com um peptídeo mimético de RGD (consulte, p. ex., as estruturas de ligante mimético de RGD divulgadas na Patente U.S. N° 9.487.556). Além disso, embora seja demonstrado que o ligante mimético de RGD tem atividade de ligação, os ligantes dirigidos à integrina da presente divulgação têm estabilidade aumentada, tanto em relação à estabilidade do soro *in vivo* quanto estabilidade química *ex vivo*, em comparação com tais ligantes miméticos de RGD baseados em peptídeo.

Exemplo 4. Modelo de camundongo com tumor renal (xenoxerto ortotópico).

Criação de células A498 de carcinoma de células claras renais que expressam SEAP (ccRCC).

[0370] Um vetor de expressão pCR3.1 que expressa a fosfatase alcalina secretada pelo gene repórter (SEAP) sob o promotor CMV foi preparado por clonagem direcional da sequência codificadora de SEAP por PCR amplificada a partir do vetor pSEAP2 básico de Clontech. Sites convenientes de restrição foram adicionados aos iniciadores usados para

amplificar a sequência de codificação SEAP para clonagem no vetor pCR3.1 (Invitrogen). A construção resultante pCR3-SEAP foi usada para criar uma linha de células A498 ccRCC que expressa SEAP. Resumidamente, o plasmídeo pCR3-SEAP foi transfetado em células A498 ccRCC por eletroporação, seguindo a recomendação do fabricante. Transfектantes estáveis foram selecionados pela resistência a G418. Os clones A498-SEAP selecionados foram avaliados quanto à expressão de SEAP e estabilidade de integração.

Implantação de células A498 de carcinoma de células claras renais que expressam SEAP (ccRCC).

[0371] Camundongos nus atípicos fêmeas foram anestesiados com ~3% de isoflourano e colocados em decúbito lateral direito. Foi feita uma pequena incisão abdominal longitudinal de 0,5-1 cm no flanco esquerdo. Usando um cotonete úmido, o rim esquerdo foi retirado do peritônio e delicadamente estabilizado. Pouco antes da injeção, uma seringa de 1,0 mL foi preenchida com a mistura de células/Matrigel e um cateter de agulha de calibre 27 foi conectado à ponta da seringa. A seringa cheia foi então conectada a uma bomba de seringa (Harvard Apparatus, modelo PHD2000) e preparada para remover o ar. A ponta de um cateter de agulha de calibre 27 conectado a uma seringa foi inserida logo abaixo da cápsula renal perto do polo caudal; a ponta da agulha foi então cuidadosamente avançada cranialmente 3-4 mm ao longo da cápsula. Uma alíquota de 10 µL de uma

mistura de células/Matrigel® 2:1 (vol:vol), contendo cerca de 300.000 células foi lentamente injetada no parênquima renal usando uma bomba de seringa. A agulha foi deixada no rim por 15-20 segundos para garantir que a injeção fosse concluída. A agulha foi então removida do rim e um cotonete foi colocado sobre o local da injeção por 30 segundos para evitar vazamento das células ou sangramento. O rim foi então colocado delicadamente de volta no abdômen e a parede abdominal foi fechada. O soro foi coletado a cada 7-14 dias após a implantação para monitorar o crescimento do tumor usando um kit de ensaio SEAP comercial. Para a maioria dos estudos, os camundongos com tumor foram usados 5-6 semanas após a implantação, quando as medições do tumor eram tipicamente de cerca de 4-8 mm.

Determinação da expressão de mRNA de HIF2.

[0372] Para os estudos relatados nos Exemplos aqui, os camundongos foram sacrificados no dia identificado após a injeção e o RNA total foi isolado do tumor renal usando o reagente Trizol, seguindo a recomendação do fabricante. Os níveis relativos de mRNA Hif2 α foram determinados por RT-qPCR conforme descrito abaixo e comparados a camundongos tratados somente com tampão de entrega (glicose isotônica).

[0373] Na preparação para PCR quantitativo, o RNA total foi isolado de amostras de tecido homogeneizadas em TriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH), seguindo o protocolo do fabricante. Aproximadamente 500 ng

de RNA foram transcritos de modo reverso usando o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). Para a expressão de Hif2 α humano (tumor) (EPAS1), foram usados testes de expressão gênica TaqMan pré-fabricados para Hif2 α humano (nº de catálogo 4331182) e nº de catálogo CycA (PPIA): 4326316E) em reações biplex em triplicado usando TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies) ou VeriQuest Probe Master Mix (Affymetrix). A PCR quantitativa foi realizada usando os sistemas 7500 Fast ou StepOnePlus Real-Time PCR (Life Technologies). O método $\Delta\Delta C_T$ foi usado para calcular a expressão gênica relativa.

Exemplo 5. Administração *in vivo* de ligantes dirigidos à integrina conjugados com agentes de RNAi com alvo em HIF-2 alfa (EPAS1) em camundongos com tumor renal.

[0374] Os agentes de RNAi que incluíram um filamento de sentido e um filamento antissentido foram sintetizados de acordo com a tecnologia de fosforamidita em fase sólida, de acordo com os procedimentos gerais conhecidos na técnica e comumente usados na síntese de oligonucleotídeos, conforme estabelecido no Exemplo 2 aqui. Os agentes de RNAi incluíram um filamento antissentido com uma sequência de bases nitrogenadas pelo menos parcialmente complementares ao gene HIF-2 alfa (Hif2 α ou EPAS1). EPAS1 é membro da família de genes HIF (fator de indução de hipóxia) e codifica metade de um fator de transcrição envolvido na indução de genes regulados por oxigênio, e que é induzido conforme os níveis

de oxigênio caem (uma condição conhecida como hipóxia), e é conhecida por ser frequentemente superexpresso em células de carcinoma renal de células claras. Os agentes de RNAi Hif2 α foram concebidos para serem capazes de degradar ou inibir a tradução de transcritos de RNA mensageiro (mRNA) de Hif2 α de uma maneira específica para a sequência, inibindo assim a expressão de um gene *EPAS1*. Os agentes de RNAi Hif2 α eram compostos de nucleotídis modificados e mais de uma ligação não fosfodiéster.

[0375] No dia de estudo 1, os camundongos com tumor renal (consulte o Exemplo 4) foram dosados por meio de injeção na veia da cauda, de acordo com os seguintes grupos de dosagem:

Tabela 2. Grupos de dosagem de camundongos com tumor renal no Exemplo 5.

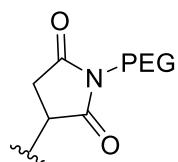
Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
1	Glicose isotônica (dextrose a 5% em água (d5w)) (sem agente de RNAi)	Injeção única no dia 1
2	7,5 mg/kg de agente Hif2 α RNAi (AD04546) conjugado com uma parte de PEG de 40 quilodalton (kDa) (sem ligante dirigido à integrina fixado), formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1

Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
3	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante à base de peptídeo mimético de RGD, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
4	7,5 mg/kg de agente Hif2α RNAi (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina de Estrutura 1a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
5	7,5 mg/kg de agente Hif2α RNAi (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1

Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
6	7,5 mg/kg de agente Hif2α RNAi (AD04546) conjugado com quatro ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2a (isto é, um grupo de direcionamento tetrudentado), e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
7	7,5 mg/kg de agente Hif2α RNAi (AD04545) conjugado com um agrupamento contendo quatro ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2a (isto é, um grupo de direcionamento tetrudentado) (sem uma parte de PEG), formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
8	7,5 mg/kg de agente Hif2α RNAi (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 20 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1

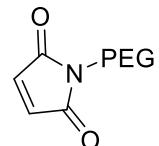
[0376] Os agentes de RNAi no Exemplo 5 foram sintetizados com sequências de nucleotídios direcionadas ao gene Hif2 α humano e incluíram um grupo reativo de amina funcionalizado (NH_2-C_6) na extremidade 5' terminal do filamento de sentido para facilitar a conjugação com os ligantes dirigidos à integrina (ou, para o Grupo 3, ao ligante à base de peptídeo mimético de RGD). As sequências modificadas dos agentes de RNAi são mostradas no Exemplo 2, acima. Para os Grupos 4 e 5, um único ligante dirigido à integrina (referido aqui como um ligante "monodentado") foi conjugado ao agente de RNAi através de um ligante de éster DBCO-PEG₅-NHS (BroadPharm), que foi conjugado com a amina primária terminal em a extremidade terminal 5' do filamento de sentido. Os respectivos ligantes dirigidos à integrina foram sintetizados possuindo um grupo reativo de azida (consulte, p. ex., o Exemplo 1), que foi então conjugado ao componente DBCO do ligante.

[0377] Os agentes de RNAi foram sintetizados com um modulador de PK denominado "parte de PEG de 20 kDA" ou "parte de PEG de 40 kDA" tendo a estrutura:



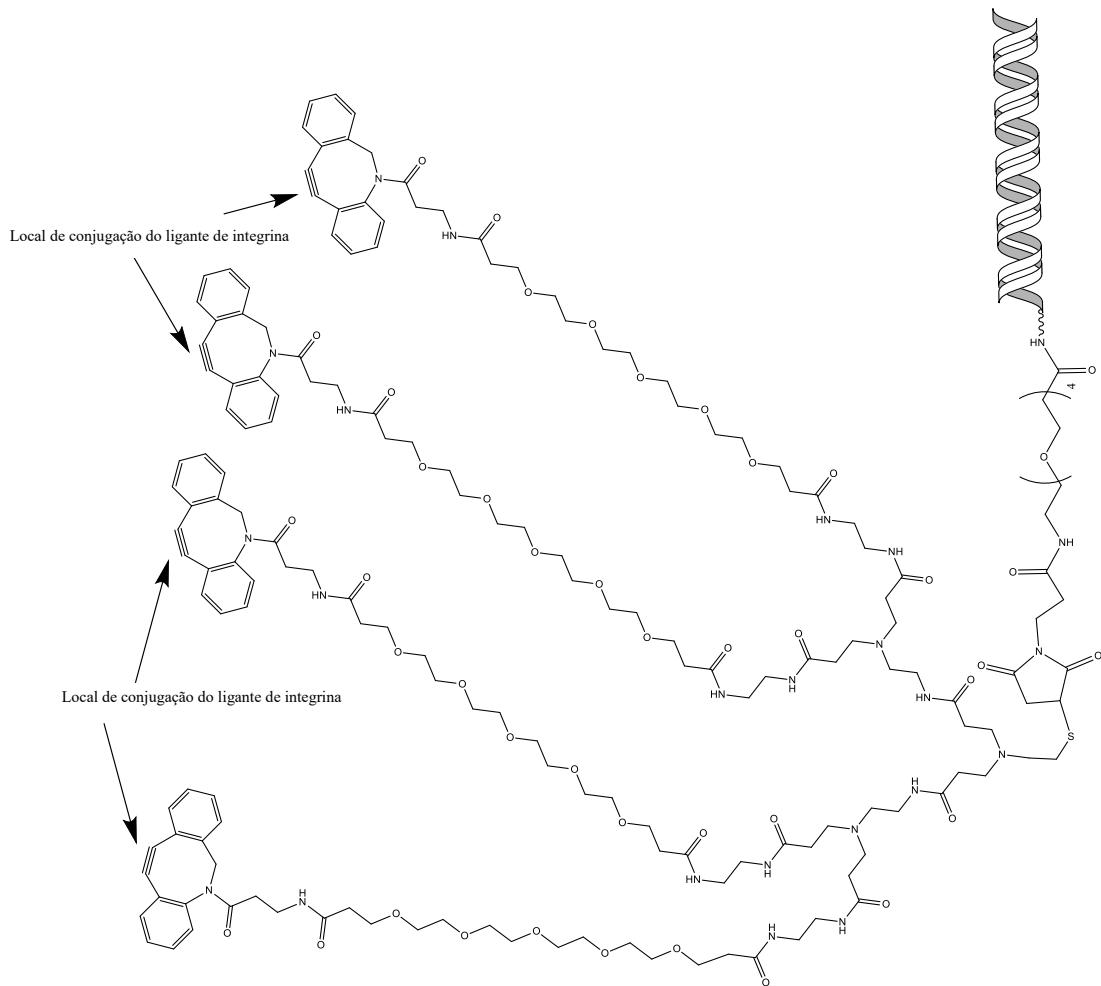
, caracterizada por $\{\}$ indicar o ponto de ligação ao agente de RNAi no grupo C6-S- como indicado em AD04546 (consulte o Exemplo 2), e PEG indicar uma cadeia de PEG de 20 kDa ou 40 kDa. O modulador de PK foi conjugado com

extremidade 3' do filamento em sentido ao reduzir o grupo C6-SS-C6, como mostrado na Tabela A, que então foi submetido



à adição de Michael com o seguinte composto:
caracterizado por PEG indicar 20 kDa ou 40 kDa Cadeia PEG.

[0378] Para os Grupos 6 e 7, quatro ligantes dirigidos à integrina foram conjugados por meio de um arcabouço tetradentado que incluía um núcleo de cistamina PAMAM-G1 funcionalizado com DBCO tendo uma estrutura geral representada pelo seguinte:



[0379] Conforme observado na Tabela 2 acima, em alguns grupos, uma parte de PEG de 40 kDa ou 20 kDa foi ligada para servir como um intensificador de PK para aumentar o tempo de circulação do conjugado do produto de droga. A parte de PEG de 40 kDa ou 20 kDa foi ligada usando um reagente da fórmula:

[0380] Três (3) camundongos com tumor receberam doses em cada Grupo ($n = 3$). Os camundongos foram sacrificados no dia de estudo 8 após a injeção, e o RNA total foi isolado do tumor renal de acordo com o procedimento estabelecido no Exemplo 4. A expressão relativa do mRNA do HIF2 α humano foi então quantificada por PCR quantitativo baseado em sonda (RT-qPCR), normalizada para a expressão da ciclofilina A humana (PPIA) e expressa como parte do grupo de controle do veículo (glicose isotônica) (média geométrica, intervalo de +/- 95% de confiança), conforme explicado no Exemplo 4.

Tabela 3. Expressão relativa média de mRNA de huHif2 α no sacrifício no Exemplo 5.

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 1 (glicose isotônica)	1,000	0,069	0,074

Grupo 2 (7,5 mg/kg de agente de RNAi) (sem ligante, PEG de 40 kDa)	0,563	0,016	0,017
Grupo 3 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante à base de peptídeo mimético de RGD, PEG de 40 kDa)	0,400	0,087	0,112
Grupo 4 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina de Estrutura 1a, PEG de 40 kDa)	0,390	0,027	0,029
Grupo 5 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina de Estrutura 2a, PEG de 40 kDa)	0,308	0,061	0,077
Grupo 6 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-grupo de direcionamento tetradentado de ligante dirigido à integrina de Estrutura 2a, PEG de 40 kDa)	0,289	0,069	0,091
Grupo 7 (7,5 mg/kg de agente de RNAi--grupo de direcionamento tetradentado de ligante dirigido à integrina de Estrutura 2a)	0,589	0,050	0,054

Grupo 8 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina de Estrutura 2a, PEG de 20 kDa)	0,647	0,098	0,115
--	-------	-------	-------

[0381] Conforme mostrado na Tabela 3 acima, cada um dos agentes de RNAi Hif2 α mostrou uma redução na expressão de mRNA em camundongos em comparação com o controle. A inclusão de uma porção de PEG de 40 kDa como um intensificador de PK geralmente melhorou a inibição da expressão do gene-alvo. Além disso, uma comparação dos Grupos 3, 4 e 5 mostrou que o ligante dirigido à integrina de Estrutura 1a aqui descrito era comparável a um ligante à base de peptídeo mimético RGD, conhecido por ter afinidade com $\alpha v\beta 3$, e o ligante da Estrutura 2a mostrou um melhoria de quase 10% no knockdown sobre o ligante mimético de RGD. Por exemplo, o Grupo 3 (mimético de RGD) teve aproximadamente 60% de knockdown (0,400); o Grupo 4 (Estrutura 1a) teve aproximadamente 61% de knockdown (0,390); e o Grupo 5 (Estrutura 2a) teve aproximadamente 69% de knockdown (0,308).

[0382] É importante ressaltar que os dados também mostraram dependência de ligante, uma vez que a inclusão de um ligante dirigido à integrina divulgado neste documento mostrou uma melhoria em comparação ao mesmo construto sem ligante. Por exemplo, o Grupo 6 (estrutura 2a de ligante dirigido à integrina tridentada) exibiu aproximadamente 72%

de *knockdown* (0,289), em comparação ao Grupo 2 (sem ligante dirigido à integrina), que exibiu somente aproximadamente 44% de *knockdown* (0,563).

[0383] Além disso, o Grupo 6 mostrou uma pequena melhora em relação ao Grupo 5, indicando uma leve preferência por um ligante multidentado em vez de um ligante monodentado; no entanto, ambas as formas eram ativas e entregavam o agente de RNAi ao rim (conforme mostrado pela inibição da expressão gênica pelo agente de RNAi).

Exemplo 6. Administração *in vivo* de ligantes dirigidos à integrina conjugados com agentes de RNAi com alvo em HIF-2 alfa em camundongos com tumor renal.

[0384] Os agentes de RNAi que incluíram um filamento de sentido e um filamento antissentido foram sintetizados de acordo com a tecnologia de fosforamidita em fase sólida, de acordo com os procedimentos gerais conhecidos na técnica e comumente usados na síntese de oligonucleotídeos, conforme estabelecido no Exemplo 2 aqui. Os agentes de RNAi tinham as respectivas sequências de nucleotídeos modificadas apresentadas no Exemplo 2 aqui e foram projetados para Hif2 α (*EPAS1*).

[0385] No dia de estudo 1, os camundongos com tumor renal (consulte o Exemplo 4) foram dosados por meio de injeção na veia da cauda, de acordo com os seguintes grupos de dosagem:

Tabela 4. Grupos de dosagem de camundongos com tumor renal no Exemplo 6.

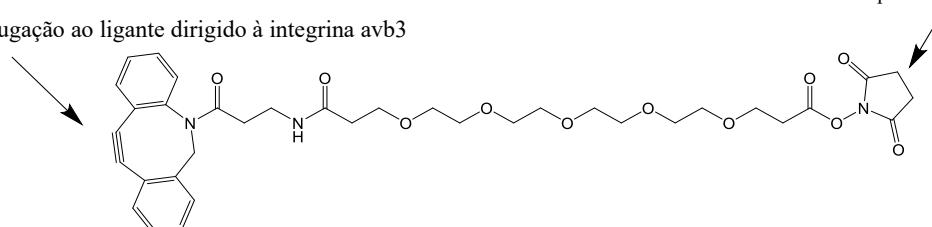
Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
1	Glicose isotônica (d5w) (sem agente de RNAi)	Injeção única no dia 1
2	30 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante à base de peptídeo mimético de RGD, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
3	15 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante à base de peptídeo mimético de RGD e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
4	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante à base de peptídeo mimético de RGD e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
5	30 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante	Injeção única no dia 1

	de integrina direcionado à Estrutura 2a e incluindo ainda uma porção PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	
6	15 mg/kg de agente de RNAi Hif2 α (AD04546) conjugado com um ligante de integrina direcionado à Estrutura 2a e incluindo ainda uma porção PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1

[0386] Os agentes de RNAi foram sintetizados com sequências de nucleotídis direcionadas ao gene Hif2 α humano e incluíram um grupo reativo de amina funcionalizado (NH_2-C_6) na extremidade 5' terminal do filamento de sentido para facilitar a conjugação aos ligantes dirigidos à integrina (ou, grupos 2, 3 e 4, ao péptido mimético de RGD). Para os Grupos 5 e 6, um único ligante dirigido à integrina (ligante "monodentado") foi conjugado ao agente de RNAi por meio do seguinte éster DBCO-PEG₅-NHS:

Conjugação ao ligante dirigido à integrina avb3

Conjugação ao agente RNAi via acoplamento de amida



[0387] Três (3) camundongos com tumor receberam doses em cada Grupo ($n = 3$). Os camundongos foram sacrificados no dia de estudo 8 após a injeção, e o RNA total foi isolado do tumor renal de acordo com o procedimento estabelecido no Exemplo 4. A expressão relativa do mRNA do HIF2 α humano foi então quantificada por PCR quantitativo baseado em sonda (RT-qPCR), normalizada para a expressão da ciclofilina A humana (PPIA) e expressa como parte do grupo de controle do veículo (glicose isotônica) (média geométrica, intervalo de +/- 95% de confiança), conforme explicado no Exemplo 4.

Tabela 5. Expressão relativa média de mRNA de Hif2 α humano no sacrifício no Exemplo 6.

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 1 (glicose isotônica)	1,000	0,072	0,078
Grupo 2 (30 mg/kg de agente de RNAi-ligante à base de peptídeo de RGD, PEG de 40 kDa)	0,300	0,041	0,047
Grupo 3 (15 mg/kg de agente de RNAi-ligante à base de peptídeo de RGD, PEG de 40 kDa)	0,330	0,080	0,106

Grupo 4 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante à base de peptídeo de RGD, PEG de 40 kDa)	0,446	0,068	0,080
Grupo 5 (30 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina de Estrutura 2a, PEG de 40 kDa)	0,198	0,007	0,007
Grupo 6 (15 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina de Estrutura 2a, PEG de 40 kDa)	0,271	0,012	0,012

[0388] Conforme mostrado na Tabela 5 acima, cada um dos agentes de RNAi Hif2 α mostrou uma redução na expressão de mRNA em comparação com o controle. Além disso, os Grupos 5 e 6, que continham o ligante dirigido à integrina de Estrutura 2a aqui divulgada, mostraram melhora no knockdown de mRNA de Hif2 α em comparação aos ligantes baseados em peptídeo mimético de RGD dos Grupos 2 e 3. (p. ex., compare o Grupo 6 (aproximadamente 73% knockdown a 15 mg/kg de agente de RNAi (0,271)) com o Grupo 3 (aproximadamente 67% de knockdown a 15 mg/kg de agente de RNAi (0,330)).

Exemplo 7. Administração in vivo de ligantes dirigidos à integrina conjugados com agentes de RNAi com alvo em HIF-2 alfa em camundongos com tumor renal.

[0389] Os agentes de RNAi que incluíram um filamento de sentido e um filamento antissentido foram sintetizados de acordo com a tecnologia de fosforamidita em fase sólida, de acordo com os procedimentos gerais conhecidos na técnica e comumente usados na síntese de oligonucleotídeos, conforme estabelecido no Exemplo 2 aqui. Os agentes de RNAi tinham as respectivas sequências de nucleotídeos modificadas apresentadas no Exemplo 2 aqui e foram projetados para Hif2 α (*EPAS1*).

[0390] No dia de estudo 1, os camundongos com tumor renal (consulte o Exemplo 4) foram dosados por meio de injeção na veia da cauda, de acordo com os seguintes grupos de dosagem:

Tabela 6. Grupos de dosagem de camundongos com tumor renal no Exemplo 7.

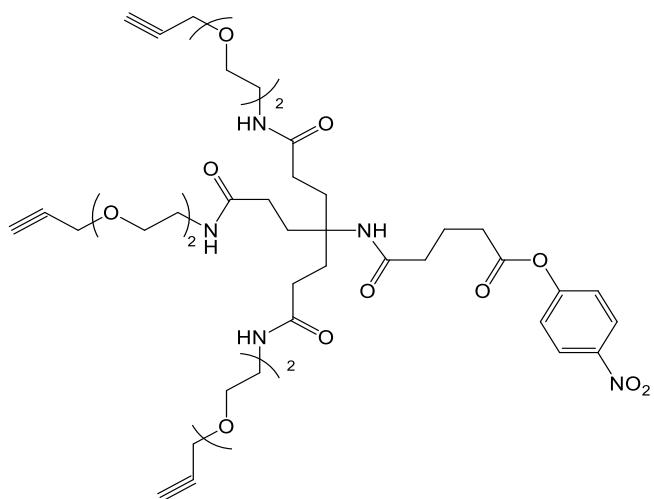
Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
1	Glicose isotônica (d5w (dextrose a 5% em água)) (sem agente de RNAi)	Injeção única no dia 1
2	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2 α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao	Injeção única no dia 1

Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
	construto, formulado em glicose isotônica.	
3	30 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
4	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2,8a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
5	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2,9a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao	Injeção única no dia 1

Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
	construto, formulado em glicose isotônica.	
6	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2,10a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
7	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2.10a, e incluindo ainda uma N-etil maleimida ligada a um 3' tiol no filamento de sentido, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1

Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
8	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2 α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina monodentada de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1

[0391] Os agentes de RNAi foram sintetizados com sequências de nucleotídeos direcionadas ao gene Hif2 α humano e incluíram um grupo reativo de amina funcionalizado (NH_2-C_6) na extremidade 5' terminal do filamento de sentido para facilitar a conjugação aos ligantes dirigidos à integrina. Para os Grupos 2 a 7, o seguinte composto foi usado para funcionalizar o conjugado com estruturas tridentadas:



[0392] Para o Grupo 8, um alcino-PEG₄-NHS éster foi usado para ligar o ligante dirigido à integrina monodentada à amina 5' no filamento de sentido. Conforme estabelecido neste documento, os Grupos 4 a 7 usaram ligantes dirigidos à integrina com comprimentos de PEG variados.

[0393] Três (3) camundongos com tumor receberam doses em cada Grupo ($n = 3$). Os camundongos foram sacrificados no dia de estudo 8 após a injeção, e o RNA total foi isolado do tumor renal de acordo com o procedimento estabelecido no Exemplo 4. A expressão relativa do mRNA do HIF2 α humano foi então quantificada por PCR quantitativo baseado em sonda (RT-qPCR), normalizada para a expressão da ciclofilina A humana (PPIA) e expressa como parte do grupo de controle do veículo (glicose isotônica) (média geométrica, intervalo de +/- 95% de confiança), conforme explicado no Exemplo 4.

Tabela 7. Expressão relativa média de mRNA de Hif2 α no sacrifício no Exemplo 7.

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2 α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 1 (glicose isotônica)	1,000	0,078	0,085
Grupo 2 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à	0,361	0,025	0,026

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
integrina de Estrutura 2a, PEG de 40 kDa)			
Grupo 3 (30 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina de Estrutura 2a, PEG de 40 kDa)	0,259	0,024	0,026
Grupo 4 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina de Estrutura 2,8a, PEG de 40 kDa)	0,428	0,062	0,073
Grupo 5 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina de Estrutura 2,9a, PEG de 40 kDa)	0,481	0,014	0,014
Grupo 6 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina de Estrutura 2,10a, PEG de 40 kDa)	0,419	0,040	0,044
Grupo 7 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à	0,627	0,054	0,060

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
integrina tridentada de Estrutura 2.10a, N-etil-maleimida)			
Grupo 8 (agente de RNAi 7,5 mg/kg- ligante dirigido à integrina monodentada de Estrutura 2a, PEG de 40 kDa)	0,537	0,041	0,045

[0394] Conforme mostrado na Tabela 7 acima, cada um dos agentes de RNAi Hif2α mostrou uma redução na expressão de mRNA em camundongos em comparação com o controle. Por exemplo, o Grupo 2, que incluiu uma dose de 7,5 mg/kg de agente de RNAi conjugado com o ligante dirigido à integrina tridentado de Estrutura 2a (que inclui um grupo PEG₄) mostrou aproximadamente 64% de knockdown de Hif2α (0,361). Além disso, embora os construtos que aumentaram o comprimento do grupo PEG para até PEG₃₆ (por exemplo, Grupos 6 e 7) mostraram todos knockdown, nenhum benefício foi visto em comparação ao grupo PEG₄ que está presente na Estrutura 2a.

Exemplo 8. Estudo de resposta à dose de administração in vivo de ligantes dirigidos à integrina conjugados com agentes

de RNAi direcionados a HIF-2 alfa em camundongos portadores de tumor renal.

[0395] Os agentes de RNAi que incluíram um filamento de sentido e um filamento antissentido foram sintetizados de acordo com a tecnologia de fosforamidita em fase sólida, de acordo com os procedimentos gerais conhecidos na técnica e comumente usados na síntese de oligonucleotídios, conforme estabelecido no Exemplo 2 aqui. Os agentes de RNAi tinham as respectivas sequências de nucleotídios modificadas apresentadas no Exemplo 2 aqui e foram projetados para Hif2 α (*EPAS1*).

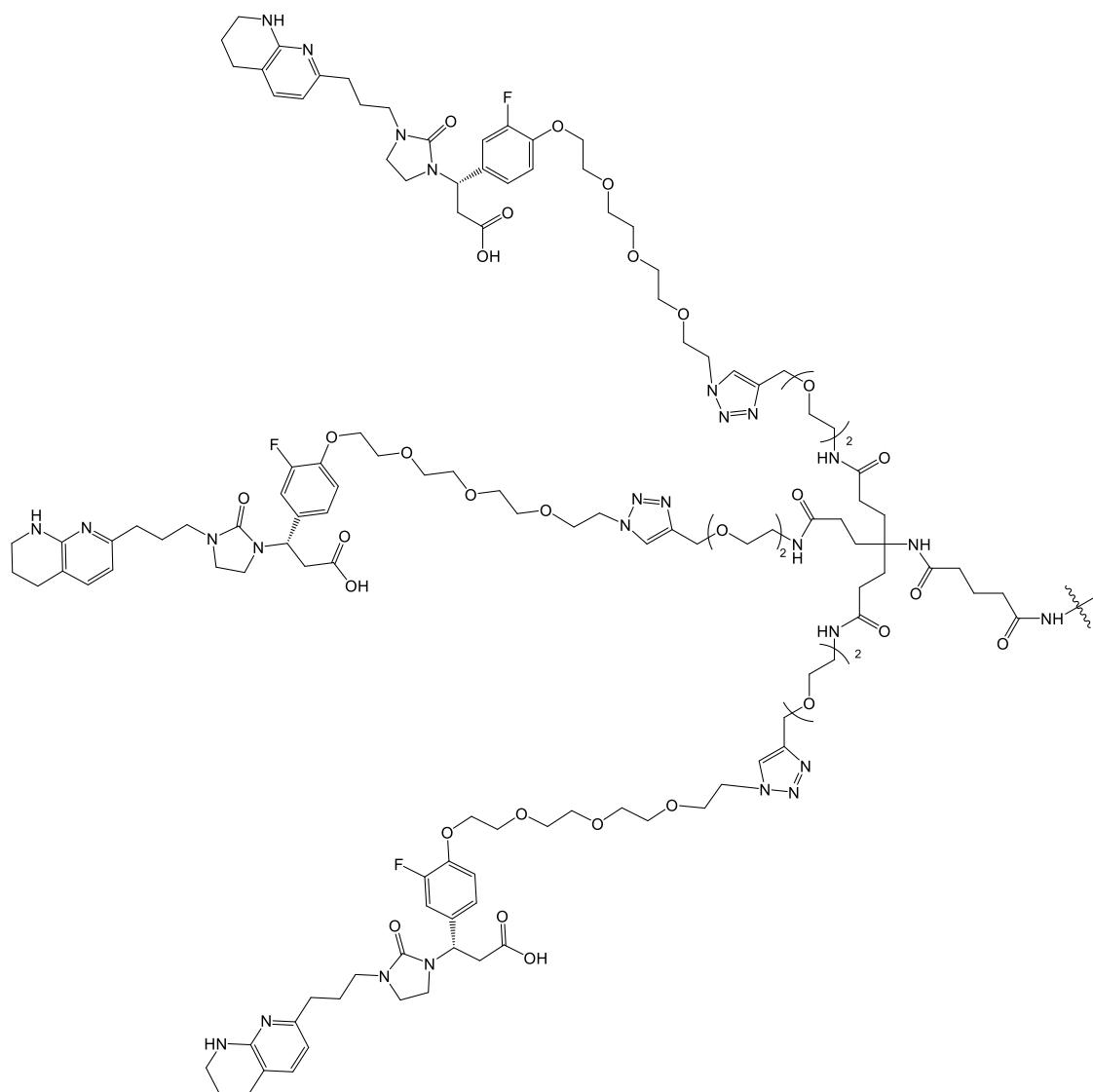
[0396] No dia de estudo 1, os camundongos com tumor renal (consulte o Exemplo 4) foram dosados por meio de injeção na veia da cauda, de acordo com os seguintes grupos de dosagem:

Tabela 8. Grupos de dosagem de camundongos com tumor renal no Exemplo 8.

Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
1	Glicose isotônica (d5w (dextrose a 5% em água)) (sem agente de RNAi)	Injeção única no dia 1
2	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2 α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma	Injeção única no dia 1

	parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	
3	10 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
4	20 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
5	30 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1

[0397] Os agentes de RNAi foram sintetizados com sequências de nucleotídeos direcionadas ao gene Hif2 α humano e incluíram um grupo reativo de amina funcionalizado ($\text{NH}_2\text{-C}_6$) na extremidade 5' terminal do filamento de sentido para facilitar a conjugação aos ligantes dirigidos à integrina. Cada um dos grupos tinha ligantes de integrina tridentados de Estrutura 2a, conforme representado pela seguinte estrutura:



[0398] Três (3) camundongos com tumor receberam doses em cada Grupo ($n = 3$). Os camundongos foram sacrificados no dia

de estudo 8 após a injeção, e o RNA total foi isolado do tumor renal de acordo com o procedimento estabelecido no Exemplo 4. A expressão relativa do mRNA do HIF2 α humano foi então quantificada por PCR quantitativo baseado em sonda (RT-qPCR), normalizada para a expressão da ciclofilina A humana (PPIA) e expressa como parte do grupo de controle do veículo (glicose isotônica) (média geométrica, intervalo de +/- 95% de confiança), conforme explicado no Exemplo 4.

Tabela 9. Expressão relativa média de mRNA de Hif2 α humano no sacrifício no Exemplo 8.

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 1 (glicose isotônica)	1,000	0,131	0,150
Grupo 2 (7,5 mg/kg de agente de RNAi)	0,313	0,027	0,030
Grupo 3 (10 mg/kg de agente de RNAi)	0,349	0,033	0,036
Grupo 4 (20 mg/kg de agente de RNAi)	0,216	0,040	0,050
Grupo 5 (30 mg/kg de agente de RNAi)	0,203	0,035	0,042

[0399] Como mostrado na Tabela 9 acima, os agentes de RNAi Hif2 α conjugados com o ligante dirigido à integrina da Estrutura 2a aqui divulgada mostraram uma redução na expressão de mRNA em camundongos em comparação com o controle em todos os níveis de dosagem.

Exemplo 9. Duração do knockdown dos agentes de RNAi com alvo em HIF-2 alfa conjugado com ligantes dirigidos à integrina em camundongos com tumor renal.

[0400] Os agentes de RNAi que incluíram um filamento de sentido e um filamento antissentido foram sintetizados de acordo com a tecnologia de fosforamidita em fase sólida, de acordo com os procedimentos gerais conhecidos na técnica e comumente usados na síntese de oligonucleotídeos, conforme estabelecido no Exemplo 2 aqui. Os agentes de RNAi tinham as respectivas sequências de nucleotídeos modificadas apresentadas no Exemplo 2 aqui e foram projetados para Hif2 α (*EPAS1*).

[0401] No dia de estudo 1, os camundongos com tumor renal (consulte o Exemplo 4) foram dosados por meio de injeção na veia da cauda, de acordo com os seguintes grupos de dosagem.

Tabela 10. Grupos de dosagem de camundongos no Exemplo 9.

Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem

1	Glicose isotônica (d5w (dextrose a 5% em água)) (sem agente de RNAi); camundongos sacrificados no dia 5	Injeção única no dia 1
A	Glicose isotônica (d5w (dextrose a 5% em água)) (sem agente de RNAi); camundongos sacrificados no dia 22	Injeção única no dia 1
2	20 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentado de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica; camundongos sacrificados no dia 5.	Injeção única no dia 1
3	20 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentado de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica; camundongos sacrificados no dia 8.	Injeção única no dia 1
4	20 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentado de	Injeção única no dia 1

	Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica; camundongos sacrificados no dia 15.	
5	20 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentado de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica; camundongos sacrificados no dia 22.	Injeção única no dia 1

[0402] Os camundongos dos Grupos 1 e 2 foram sacrificados no dia 5 após a injeção; os camundongos do Grupo 3 foram sacrificados no dia 8 após a injeção; camundongos do Grupo 4 foram sacrificados no dia 15 após a injeção; e os camundongos dos Grupos 1A e 5 foram sacrificados no dia 22 após a injeção.

[0403] Para os grupos de controle de veículo, dois camundongos foram administrados no Grupo 1 e três camundongos foram administrados no Grupo 1A. Para os grupos contendo ligante dirigido à integrina-agente de RNAi (isto é, Grupos 2, 3, 4 e 5) quatro (4) camundongos com tumor foram dosados em cada grupo (n=4). O RNA total foi isolado do tumor renal

de acordo com os procedimentos apresentados no Exemplo 4. A expressão relativa do mRNA do HIF2 α humano foi então quantificada por PCR quantitativo baseado em sonda (RT-qPCR), normalizada para a expressão da ciclofilina A humana (PPIA) e expressa como parte do grupo de controle do veículo (glicose isotônica) (média geométrica, intervalo de +/- 95% de confiança), conforme explicado no Exemplo 4.

Tabela 11. Expressão relativa média de mRNA de Hif2 α humano no sacrifício no Exemplo 9.

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 1 (glicose isotônica; sacrifício no dia 5)	0,741	0,028	0,029
Grupo 1A (glicose isotônica; sacrifício no dia 22)	1,000	0,066	0,070
Grupo 2 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, PEG de 40 kDa; sacrifício no dia 5)	0,262	0,028	0,031

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 3 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, PEG de 40 kDa; sacrificio no dia 5)	0,202	0,021	0,023
Grupo 4 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, PEG de 40 kDa; sacrificio no dia 8)	0,233	0,034	0,039
Grupo 5 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, PEG de 40 kDa; sacrificio no dia 15)	0,299	0,017	0,018

[0404] Como mostrado na Tabela 11 acima, os agentes de RNAi Hif2 α continuaram a mostrar uma redução na expressão de

mRNA em comparação ao controle no dia 22 (aproximadamente 70% de *knockdown* no dia 22 (0,299)).

Exemplo 10. Administração *in vivo* de ligantes dirigidos à integrina conjugados com agentes de RNAi com alvo em HIF-2 alfa em camundongos com tumor renal.

[0405] Os agentes de RNAi que incluíram um filamento de sentido e um filamento antissentido foram sintetizados de acordo com a tecnologia de fosforamidita em fase sólida, de acordo com os procedimentos gerais conhecidos na técnica e comumente usados na síntese de oligonucleotídeos, conforme estabelecido no Exemplo 2 aqui. Os agentes de RNAi tinham as respectivas sequências de nucleotídeos modificadas apresentadas no Exemplo 2 aqui e foram projetados para Hif2 α (*EPAS1*) .

[0406] No dia de estudo 1, os camundongos com tumor renal (consulte o Exemplo 4) foram dosados por meio de injeção na veia da cauda, de acordo com os seguintes grupos de dosagem:

Tabela 12. Grupos de dosagem de camundongos no Exemplo 10.

Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
1	Glicose isotônica (d5w (dextrose a 5% em água)) (sem agente de RNAi)	Injeção única no dia 1
2	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2 α (AD04546) conjugado com um ligante	Injeção única no dia 1

	dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	
3	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2,6a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1

[0407] Os agentes de RNAi foram sintetizados com sequências de nucleotídeos direcionadas ao gene Hif2α humano e incluíram um grupo reativo de amina funcionalizado ($\text{NH}_2\text{-C}_6$) na extremidade 5' terminal do filamento de sentido para facilitar a conjugação aos ligantes dirigidos à integrina.

[0408] Três (3) camundongos com tumor receberam doses em cada Grupo ($n = 3$). Os camundongos foram sacrificados no dia de estudo 8 após a injeção, e o RNA total foi isolado do tumor renal de acordo com o procedimento estabelecido no Exemplo 4. A expressão relativa do mRNA do HIF2α humano foi então quantificada por PCR quantitativo baseado em sonda (RT-qPCR), normalizada para a expressão da ciclofilina A humana (PPIA) e expressa como parte do grupo de controle do

veículo (glicose isotônica) (média geométrica, intervalo de +/- 95% de confiança), conforme explicado no Exemplo 4.

Tabela 13. Expressão relativa média de mRNA de Hif2 α no sacrifício no Exemplo 10.

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 1 (glicose isotônica)	1,000	0,087	0,095
Grupo 2 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina de Estrutura 2a, PEG de 40 kDa)	0,351	0,080	0,104
Grupo 3 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina de Estrutura 2,6a, PEG de 40 kDa)	0,441	0,040	0,043

[0409] Conforme mostrado na Tabela 13 acima, cada um dos conjugados de agente de RNAi Hif2 α -ligante de integrina mostrou uma redução na expressão de mRNA em camundongos em comparação ao controle. Por exemplo, o Grupo 2, que incluiu

uma dose de 7,5 mg/kg de agente de RNAi conjugado com o ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, mostrou aproximadamente 65% de knockdown de mRNA de Hif2 α (0,351).

Exemplo 11. Administração in vivo de ligantes dirigidos à integrina conjugados com agentes de RNAi com alvo em HIF-2 alfa em camundongos com tumor renal $\alpha v \beta 3$ KO A498.

[0410] As células tumorais A498 do carcinoma de células renais de células claras (ccRCC) expressam integrinas $\alpha v \beta 3$ e $\alpha v \beta 5$, com expressão de $\alpha v \beta 3$ cerca de 4 vezes maior do que $\alpha v \beta 5$ por análise de citometria de fluxo. Para avaliar a contribuição de $\alpha v \beta 5$ neste modelo, células $\alpha v \beta 3$ knockout (KO) A498 foram sintetizadas via tecnologia de edição de genes. O knockout da integrina $\alpha v \beta 3$ foi confirmado por sequenciamento genômico e coloração imunohistoquímica de $\alpha v \beta 3$, que mostrou que a coloração foi negativa nas células $\alpha v \beta 3$ KO A498. Os camundongos com tumor renal com A498 WT (com $\alpha v \beta 3$ e $\alpha v \beta 5$) e células $\alpha v \beta 3$ KO A498 foram preparados como descrito acima no Exemplo 4.

[0411] No dia de estudo 1, camundongos portadores de tumor renal receberam doses via injeção na veia da cauda. Três (3) camundongos com tumor receberam doses em cada Grupo apresentado na Tabela 13, abaixo ($n = 3$). Os camundongos foram sacrificados no dia de estudo 8 após a injeção, e o RNA total foi isolado do tumor renal conforme o procedimento estabelecido no Exemplo 4. A expressão relativa do mRNA do

HIF2 α humano foi quantificada por PCR quantitativo baseado em sonda (RT-qPCR), normalizada para a expressão da Ciclofilina A humana (PPIA) e expressa como parte do grupo de controle do veículo (glicose isotônica) (média geométrica, intervalo de +/- 95% de confiança), conforme estabelecido no Exemplo 4.

Tabela 14. Expressão relativa média de mRNA de Hif2 α no sacrificio no Exemplo 11.

Identificação de grupo	Tumor	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2 α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 1 (glicose isotônica)	A498 WT	1,000	0,084	0,092
Grupo 2 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante direcionado à integrina tridentada de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto)	A498 WT	0,295	0,040	0,046

Grupo 3 (glicose isotônica)	A498 $\alpha v \beta 3$ KO	1,000	0,232	0,302
Grupo 4 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante direcionado à integrina tridentada de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte de PEG de 40 kDa ligada ao construto)	A498 $\alpha v \beta 3$ KO	0,621	0,068	0,077

[0412] Como mostrado na Tabela 14 acima, os conjugados de agente de RNAi Hif2 α -integrina ligante mostraram uma redução na expressão de mRNA Hif2 α em tumores A498 WT (tipo selvagem) em comparação com o controle (cerca de 71% (0,295) knockdown). Em contraste, como esperado, a redução na expressão de mRNA de Hif2 α foi menos eficiente em tumores A498 $\alpha v \beta 3$ KO; entretanto, a redução foi substancial em 38% (0,621) knockdown. Isso mostra que tanto a integrina $\alpha v \beta 3$ quanto a integrina $\alpha v \beta 5$ contribuem para a entrega do agente de RNAi.

Exemplo 12. Administração in vivo de ligantes dirigidos à integrina conjugados com agentes de RNAi com alvo em HIF-2 alfa em camundongos com tumor renal.

[0413] Os agentes de RNAi que incluíram um filamento de sentido e um filamento antissentido foram sintetizados de acordo com a tecnologia de fosforamidita em fase sólida, de acordo com os procedimentos gerais conhecidos na técnica e comumente usados na síntese de oligonucleotídeos, conforme estabelecido no Exemplo 2 aqui. Os agentes de RNAi tinham as respectivas sequências de nucleotídeos modificadas apresentadas no Exemplo 2 aqui e foram projetados para Hif2 α (*EPAS1*).

[0414] No dia de estudo 1, os camundongos com tumor renal (consulte o Exemplo 4) foram dosados por meio de injeção na veia da cauda, de acordo com os seguintes grupos de dosagem:

Tabela 15. Grupos de dosagem de camundongos no Exemplo 12.

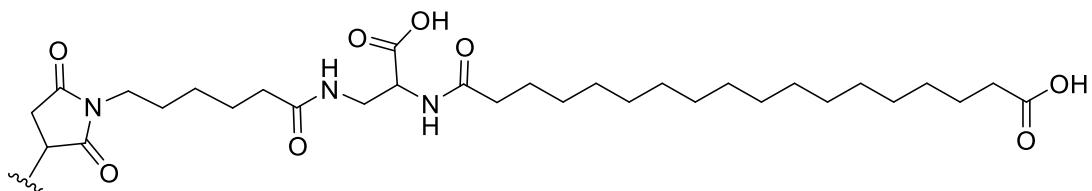
Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
1	Glicose isotônica (d5w (dextrose a 5% em água)) (sem agente de RNAi)	Injeção única no dia 1
2	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2 α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, e incluindo ainda uma parte C18-diácido ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1

6	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 28a, e incluindo ainda uma parte Mal-C18-diácido ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
7	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 29a, e incluindo ainda uma parte Mal-C18-diácido ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
8	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 30a, e incluindo ainda uma parte Mal-C18-diácido ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	Injeção única no dia 1
9	7,5 mg/kg de agente de RNAi Hif2α (AD04546) conjugado com um ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 31a, e incluindo ainda uma	Injeção única no dia 1

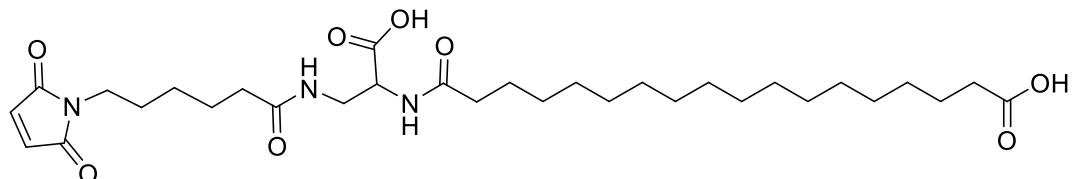
	parte Mal-C18-diácido ligada ao construto, formulado em glicose isotônica.	
--	--	--

[0415] Os agentes de RNAi foram sintetizados com sequências de nucleotídos direcionadas ao gene Hif2 α humano e incluíram um grupo reativo de amina funcionalizado (NH_2-C_6) na extremidade 5' terminal do filamento de sentido para facilitar a conjugação aos ligantes dirigidos à integrina.

[0416] Os agentes de RNAi foram sintetizados com um modulador de PD referido como "parte Mal-C18-diácido" com a estrutura:



caracterizado por $\tilde{\text{ }}$ indicar o ponto de ligação ao agente de RNAi no grupo C6-S- como indicado em AD05971 (consulte o Exemplo 2). O modulador de PD foi conjugado com extremidade 3' do filamento em sentido reduzindo o grupo C6-SS-C6, como mostrado na Tabela A, que então passou por adição de Michael com o seguinte composto:



[0417] Três (3) camundongos com tumor receberam doses em cada Grupo ($n = 3$). Os camundongos foram sacrificados no dia de estudo 8 após a injeção, e o RNA total foi isolado do tumor renal de acordo com o procedimento estabelecido no Exemplo 4. A expressão relativa do mRNA do HIF2 α humano foi então quantificada por PCR quantitativo baseado em sonda (RT-qPCR), normalizada para a expressão da ciclofilina A humana (PPIA) e expressa como parte do grupo de controle do veículo (glicose isotônica) (média geométrica, intervalo de +/- 95% de confiança), conforme explicado no Exemplo 4.

Tabela 16. Expressão relativa média de mRNA de Hif2 α no sacrifício no Exemplo 12.

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 1 (glicose isotônica)	1,000	0,077	0,083
Grupo 2 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, Mal-C18-diácido)	0,456	0,113	0,150

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 6 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 28a, Mal-C18-diácido)	0,649	0,072	0,081
Grupo 7 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 29a, Mal-C18-diácido)	0,426	0,054	0,062
Grupo 8 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 30a, Mal-C18-diácido)	0,699	0,064	0,070
Grupo 9 (7,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 31a, Mal-C18-diácido)	0,580	0,069	0,079

Conforme mostrado na Tabela 16 acima, cada um dos conjugados de agente de RNAi Hif2 α -ligante direcionado à integrina mostrou uma redução na expressão de mRNA em comparação ao controle.

Exemplo 13. Administração in vivo de ligantes dirigidos à integrina conjugados com agentes de RNAi com alvo em HIF-2 alfa em camundongos com tumor renal.

[0418] Os agentes de RNAi que incluíram um filamento de sentido e um filamento antissentido foram sintetizados de acordo com a tecnologia de fosforamidita em fase sólida, de acordo com os procedimentos gerais conhecidos na técnica e comumente usados na síntese de oligonucleotídeos, conforme estabelecido no Exemplo 2 aqui. Os agentes de RNAi tinham as respectivas sequências de nucleotídeos modificadas apresentadas no Exemplo 2 aqui e foram projetados para Hif2 α (*EPAS1*).

[0419] No dia de estudo 1, os camundongos com tumor renal (consulte o Exemplo 4) foram dosados por meio de injeção na veia da cauda, de acordo com os seguintes grupos de dosagem:

Tabela 17. Grupos de dosagem de camundongos no Exemplo 13.

Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
1	Glicose isotônica (d5w (dextrose a 5% em água)) (sem agente de RNAi)	Injeção única no dia 1

4	<p>5,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 2a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
----------	---	-------------------------------

5	<p>5,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 32a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 32a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

6	<p>5,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 33a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 33a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

7	<p>5,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 34a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 34a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3' → 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	--	-------------------------------

⁽ⁱ⁾ Os ligantes de direcionamento avb3 estão ligados aos nucleotídeos 2'-O-propargil (representados por aAlk, gAlk e uAlk na sequência do filamento modificado de sentido), que, quando vistos em 5' → 3' na sequência do filamento de sentido estão nos nucleotídeos 14, 16, 18 e 20 no filamento de sentido.

[0420] Três (3) camundongos com tumor receberam doses em cada Grupo (n = 3). Os camundongos foram sacrificados no dia

de estudo 8 após a injeção, e o RNA total foi isolado do tumor renal de acordo com o procedimento estabelecido no Exemplo 4. A expressão relativa do mRNA do HIF2 α humano foi então quantificada por PCR quantitativo baseado em sonda (RT-qPCR), normalizada para a expressão da ciclofilina A humana (PPIA) e expressa como parte do grupo de controle do veículo (glicose isotônica) (média geométrica, intervalo de +/- 95% de confiança), conforme explicado no Exemplo 4.

Tabela 18. Expressão relativa média de mRNA de Hif2 α no sacrificio no Exemplo 13.

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 1 (glicose isotônica)	1,000	0,083	0,090
Grupo 4 (5,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, três ligantes internos da Estrutura 2a e modulador PD C-18-diácido)	0,245	0,048	0,059

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 5 (5,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 32a, três ligantes internos da Estrutura 32a e modulador PD C-18-diácido)	0,213	0,065	0,094
Grupo 6 (5,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 33a, três ligantes internos de Estrutura 33a e C-18-diácido)	0,603	0,117	0,146

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 7 (5,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 34a, três ligantes internos de Estrutura 34a e C-18-diácido)	0,528	0,067	0,077

[0421] Conforme mostrado na Tabela 18 acima, cada um dos conjugados de agente de RNAi Hif2 α -ligante dirigido à integrina mostrou uma redução na expressão de mRNA em camundongos em comparação ao controle, com os construtos que incluíam os ligantes dirigidos à integrina direcionados à Estrutura 2a e Estrutura 32a mostrando a maior atividade inibitória.

Exemplo 14. Administração in vivo de ligantes dirigidos à integrina conjugados com agentes de RNAi com alvo em HIF-2 alfa em camundongos com tumor renal.

[0422] Os agentes de RNAi que incluíram um filamento de sentido e um filamento antissentido foram sintetizados de

acordo com a tecnologia de fosforamidita em fase sólida, de acordo com os procedimentos gerais conhecidos na técnica e comumente usados na síntese de oligonucleotídeos, conforme estabelecido no Exemplo 2 aqui. Os agentes de RNAi tinham as respectivas sequências de nucleotídeos modificadas apresentadas no Exemplo 2 aqui e foram projetados para Hif2 α (*EPAS1*) .

[0423] No dia de estudo 1, os camundongos com tumor renal (consulte o Exemplo 4) foram dosados por meio de injeção na veia da cauda, de acordo com os seguintes grupos de dosagem:

Tabela 19. Grupos de dosagem de camundongos no Exemplo 14.

Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
1	Glicose isotônica (d5w (dextrose a 5% em água)) (sem agente de RNAi)	Injeção única no dia 1

2	<p>2,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2,11a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,11a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

5	<p>2,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 36a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 36a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

6	<p>2,0 mg/kg de agente de RNAi HIF-2 alfa AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com a estrutura do ligante dirigido à integrina SM37-avb3, tendo um ligante de direcionamento de SM37-avb3 ligado internamente na posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3' → 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido⁽ⁱ⁾, e ainda ligada na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador de PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
----------	--	-------------------------------

⁽ⁱ⁾ Os ligantes de direcionamento avb3 estão ligados aos nucleotídeos 2'-O-propargil (representados por aAlk, gAlk e uAlk na sequência do filamento modificado de sentido), que, quando vistos em 5' → 3' na sequência do filamento de sentido estão nos nucleotídeos 14, 16, 18 e 20 no filamento de sentido.

[0424] Três (3) camundongos com tumor receberam doses em cada Grupo (n = 3). Os camundongos foram sacrificados no dia

de estudo 8 após a injeção, e o RNA total foi isolado do tumor renal de acordo com o procedimento estabelecido no Exemplo 4. A expressão relativa do mRNA do HIF2 α humano foi então quantificada por PCR quantitativo baseado em sonda (RT-qPCR), normalizada para a expressão da ciclofilina A humana (PPIA) e expressa como parte do grupo de controle do veículo (glicose isotônica) (média geométrica, intervalo de +/- 95% de confiança), conforme explicado no Exemplo 4.

Tabela 20. Expressão relativa média de mRNA de Hif2 α no sacrificio no Exemplo 14.

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 1 (glicose isotônica)	1,000	0,090	0,099
Grupo 2 (2,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2,11a, três ligantes internos de Estrutura 2,11a e C-18-diácido)	0,362	0,021	0,022

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 5 (2,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 36a, três ligantes internos de Estrutura 36a e C-18-diácido)	0,617	0,028	0,029
Grupo 6 (2,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 37a, três ligantes internos de Estrutura 37a e C-18-diácido)	0,375	0,081	0,103

[0425] Conforme mostrado na Tabela 20 acima, cada um dos conjugados de agente de RNAi Hif2 α -ligante direcionado à integrina mostrou uma redução na expressão de mRNA em comparação ao controle.

Exemplo 15. Administração in vivo de ligantes dirigidos à integrina conjugados com agentes de RNAi com alvo em HIF-2 alfa em camundongos com tumor renal.

[0426] Os agentes de RNAi que incluíram um filamento de sentido e um filamento antissentido foram sintetizados de acordo com a tecnologia de fosforamidita em fase sólida, de acordo com os procedimentos gerais conhecidos na técnica e comumente usados na síntese de oligonucleotídeos, conforme estabelecido no Exemplo 2 aqui. Os agentes de RNAi tinham as respectivas sequências de nucleotídeos modificadas apresentadas no Exemplo 2 aqui e foram projetados para Hif2 α (*EPAS1*) .

[0427] No dia de estudo 1, os camundongos com tumor renal (consulte o Exemplo 4) foram dosados por meio de injeção na veia da cauda, de acordo com os seguintes grupos de dosagem:

Tabela 21. Grupos de dosagem de camundongos no Exemplo 15.

Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
1	Glicose isotônica (d5w (dextrose a 5% em água)) (sem agente de RNAi)	Injeção única no dia 1

2	<p>2,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2,11a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,11a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

3	<p>4,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2,11a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,11a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

6	<p>2,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 38a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 38a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

7	<p>4,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 38a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 38a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

8	<p>2,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 39a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 39a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

9	<p>4,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 39a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 39a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

10	<p>2,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 40a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 40a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
----	---	-------------------------------

11	<p>4,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 40a, com um ligante dirigido à integrina de Estrutura 40a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3' → 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
-----------	---	-------------------------------

12	<p>2,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 41a, com um ligante dirigido à integrina de Estrutura 41a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3' → 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
----	---	-------------------------------

13	<p>4,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 41a, com um ligante dirigido à integrina de Estrutura 41a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídis 2, 4, 6 e 8 (3' → 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
----	--	-------------------------------

⁽ⁱ⁾ Os ligantes de direcionamento avb3 estão ligados aos nucleotídis 2'-O-propargil (representados por aAlk, gAlk e uAlk na sequência do filamento modificado de sentido), que, quando vistos em 5' → 3' na sequência do filamento de sentido estão nos nucleotídis 14, 16, 18 e 20 no filamento de sentido.

[0428] Três (3) camundongos com tumor receberam doses em cada Grupo (n = 3). Os camundongos foram sacrificados no dia

de estudo 8 após a injeção, e o RNA total foi isolado do tumor renal de acordo com o procedimento estabelecido no Exemplo 4. A expressão relativa do mRNA do HIF2 α humano foi então quantificada por PCR quantitativo baseado em sonda (RT-qPCR), normalizada para a expressão da ciclofilina A humana (PPIA) e expressa como parte do grupo de controle do veículo (glicose isotônica) (média geométrica, intervalo de +/- 95% de confiança), conforme explicado no Exemplo 4.

Tabela 22. Expressão relativa média de mRNA de Hif2 α no sacrifício no Exemplo 15.

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 1 (glicose isotônica)	1,000	0,247	0,327
Grupo 2 (2,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2,11a, três ligantes internos de Estrutura 2,11a e C-18-diácido)	0,286	0,037	0,043

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 3 (4,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2,11a, três ligantes internos de Estrutura 2,11a e C-18-diácido)	0,263	0,035	0,040
Grupo 6 (2,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 38a, três ligantes internos de Estrutura 38a e C-18-diácido)	0,655	0,050	0,054

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 7 (4,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 38a, três ligantes internos de Estrutura 38a e C-18-diácido)	0,488	0,042	0,046
Grupo 8 (2,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 39a, três ligantes internos de Estrutura 39a e C-18-diácido)	0,609	0,065	0,073

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 9 (4,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 39a, três ligantes internos de Estrutura 39a e C-18-diácido)	0,518	0,050	0,055
Grupo 10 (2,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 40a, três ligantes internos de Estrutura 40a e C-18-diácido)	0,805	0,113	0,132

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 11 (4,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 40a, três ligantes internos de Estrutura 40a e C-18-diácido)	0,738	0,091	0,104
Grupo 12 (2,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 41a, três ligantes internos de Estrutura 41a e C-18-diácido)	0,978	0,082	0,090

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 13 (4,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 41a, três ligantes internos de Estrutura 41a e C-18-diácido)	0,779	0,106	0,123

[0429] Conforme mostrado na Tabela 22 acima, cada um dos conjugados de agente de RNAi Hif2 α -ligante de integrina mostrou uma redução na expressão de mRNA em camundongos em comparação ao controle.

Exemplo 16. Administração in vivo de ligantes dirigidos à integrina conjugados com agentes de RNAi com alvo em HIF-2 alfa em camundongos com tumor renal.

[0430] Os agentes de RNAi que incluíram um filamento de sentido e um filamento antissenso foram sintetizados de acordo com a tecnologia de fosforamidita em fase sólida, de acordo com os procedimentos gerais conhecidos na técnica e comumente usados na síntese de oligonucleotídeos, conforme

estabelecido no Exemplo 2 aqui. Os agentes de RNAi tinham as respectivas sequências de nucleotídeos modificadas apresentadas no Exemplo 2 aqui e foram projetados para Hif2 α (*EPAS1*).

[0431] No dia de estudo 1, os camundongos com tumor renal (consulte o Exemplo 4) foram dosados por meio de injeção na veia da cauda, de acordo com os seguintes grupos de dosagem:

Tabela 23. Grupos de dosagem de camundongos no Exemplo 16.

Grupo	Agente de RNAi e dose	Regime de dosagem
1	Salina (0,9%) (sem agente de RNAi)	Injeção única no dia 1

2	<p>2,5 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2,11a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,11a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

3	<p>5,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2,11a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,11a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

4	<p>10,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2,11a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,11a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
----------	--	-----------------------------------

5	<p>2,5 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2,11a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,11a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

6	<p>5,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2,11a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,11a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

7	<p>10,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2,11a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 2,11a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	--	-------------------------------

8	<p>2,5 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 2a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

9	<p>5,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 2a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3→' 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
---	---	-------------------------------

10	<p>10,0 mg/kg de agente HIF-2 alfa RNAi AD05971, ligado na extremidade 5' terminal do filamento de sentido a um grupo de direcionamento tridentado com três ligantes dirigidos à integrina de Estrutura 2a, com um ligante dirigido à integrina da Estrutura 2a ligado internamente no Posição 2' de cada um dos nucleotídeos 2, 4, 6 e 8 (3' → 5') do primeiro nucleotídeo, que forma um par de bases com o filamento antissentido ⁽ⁱ⁾, e ligada adicionalmente na extremidade terminal 3' do filamento de sentido no modulador PD Mal-C18-diácido, formulado em glicose isotônica.</p>	<p>Injeção única no dia 1</p>
----	---	-------------------------------

⁽ⁱ⁾ Os ligantes de direcionamento avb3 estão ligados aos nucleotídeos 2'-O-propargil (representados por aAlk, gAlk e uAlk na sequência do filamento modificado de sentido), que, quando vistos em 5' → 3' na sequência do filamento de sentido estão nos nucleotídeos 14, 16, 18 e 20 no filamento de sentido.

[0432] Quatro (4) camundongos com tumor receberam doses em cada Grupo (n=4), exceto no Grupo 4 que tinha apenas (3)

camundongos, pois considerou-se que um camundongo recebeu injeção com falha. Os camundongos foram sacrificados no dia de estudo 8 após a injeção, e o RNA total foi isolado do tumor renal de acordo com o procedimento estabelecido no Exemplo 4. A expressão relativa do mRNA do HIF2 α humano foi então quantificada por PCR quantitativo baseado em sonda (RT-qPCR), normalizada para a expressão da ciclofilina A humana (PPIA) e expressa como parte do grupo de controle do veículo (glicose isotônica) (média geométrica, intervalo de +/- 95% de confiança), conforme explicado no Exemplo 4.

Tabela 24. Expressão relativa média de mRNA de Hif2 α no sacrifício no Exemplo 16.

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 1 (glicose isotônica)	1,000	0,180	0,220

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 2 (2,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2,11a, três ligantes internos de Estrutura 2,11a e C-18-diácido)	0,278	0,068	0,091
Grupo 3 (5,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2,11a, três ligantes internos de Estrutura 2,11a e C-18-diácido)	0,229	0,062	0,086

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 4 (10,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2,11a, três ligantes internos de Estrutura 2,11a e C-18-diácido)	0,202	0,014	0,015
Grupo 5 (2,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2,11a, três ligantes internos de Estrutura 2,11a e C-18-diácido)	0,324	0,035	0,040

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 6 (5,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2,11a, três ligantes internos de Estrutura 2,11a e C-18-diácido)	0,308	0,018	0,019
Grupo 7 (10,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2,11a, três ligantes internos de Estrutura 2,11a e C-18-diácido)	0,197	0,041	0,052

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 8 (2,5 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, três ligantes internos de Estrutura 2a e C-18-diácido)	0,218	0,048	0,062
Grupo 9 (5,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, três ligantes internos de Estrutura 2a e C-18-diácido)	0,160	0,065	0,109

Identificação de grupo	Expressão relativa média de mRNA de huHIF2α	Baixo (erro)	Alto (erro)
Grupo 10 (10,0 mg/kg de agente de RNAi-ligante dirigido à integrina tridentada de Estrutura 2a, três ligantes internos de Estrutura 2a e C-18-diácido)	0,276	0,053	0,066

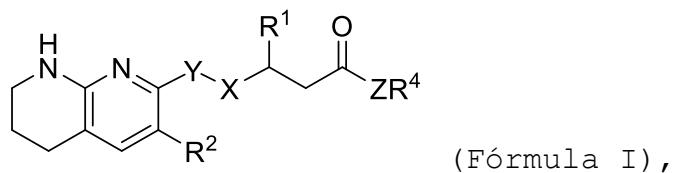
[0433] Conforme mostrado na Tabela 24 acima, cada um dos conjugados de agente de RNAi Hif2 α -ligante de integrina mostrou uma redução na expressão de mRNA em camundongos em comparação ao controle.

OUTRAS MODALIDADES

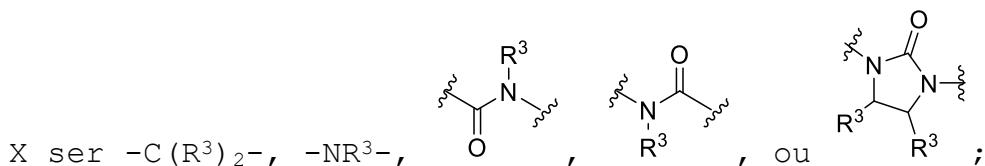
[0434] Deve ser entendido que mesmo que a invenção tenha sido descrita em conjunção com a descrição detalhada desta, a descrição anterior se destina a ilustrar e não limitar o escopo da invenção, que é definido pelo escopo das reivindicações anexas. Outros aspectos, vantagens e modificações estão dentro do escopo das reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Um ligante dirigido à integrina da fórmula:



caracterizado por



Y ser um alquíleno substituído facultativamente;

Z ser O, NR³ ou S;

n ser um número inteiro de 1 a 8;

R¹ ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R¹ compreender uma molécula transportadora;

R² ser H, um alquil substituído facultativamente ou R² compreender uma molécula transportadora;

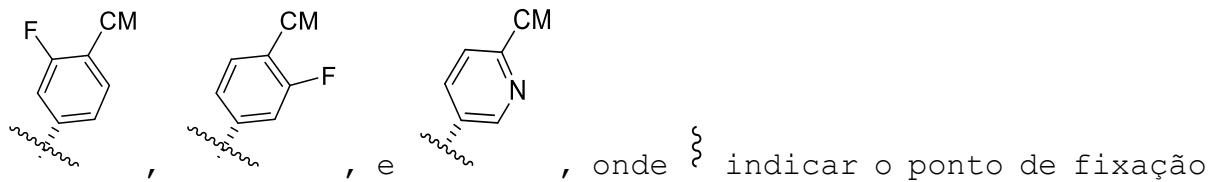
cada instância de R³ ser selecionada de maneira independente a partir do grupo consistindo em H e um alquil substituído facultativamente ou R³ compreender uma molécula transportadora;

R⁴ ser H ou um alquil substituído facultativamente; e

onde pelo menos um de Y, R¹, R², qualquer instância de R³ e R⁴ compreender uma molécula transportadora.

2. O ligante de direcionamento, de acordo com a Reivindicação 1 caracterizado por R¹ ser um aril substituído facultativamente.

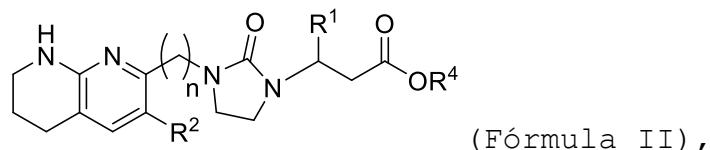
3. O ligante de direcionamento, de acordo com a Reivindicação 2 caracterizado por R¹ ser selecionado do grupo que consiste em:



e CM compreende uma molécula transportadora.

4. O ligante de direcionamento, de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por Y ser um alquíleno C₁ a C₆.

5. Um ligante dirigido à integrina da fórmula:



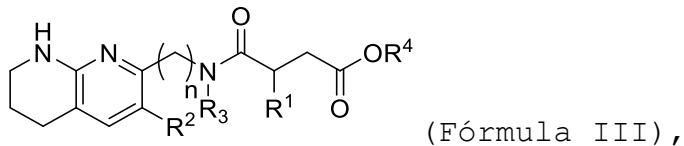
ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, caracterizado por n ser um número inteiro de 1 a 8;

R¹ ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R¹ compreender uma molécula transportadora;

R² ser H, um alquil substituído facultativamente ou R² compreender uma molécula transportadora;

R⁴ ser H ou um alquil substituído facultativamente; e onde pelo menos um de R¹ ou R² compreender uma molécula transportadora.

6. Um ligante dirigido à integrina da fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, caracterizado por
n ser um número inteiro de 1 a 8;

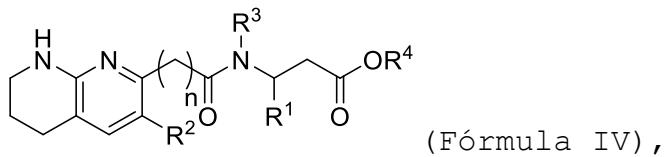
R¹ ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril
substituído facultativamente, um heterociclico substituído
facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente
ou R¹ compreender uma molécula transportadora;

R² ser H, um alquil substituído facultativamente ou R²
compreender uma molécula transportadora;

R³ ser selecionado de maneira independente a partir do grupo
consistindo em H e um alquil substituído facultativamente ou R³
compreender uma molécula transportadora;

R⁴ ser H ou um alquil substituído facultativamente; e
onde pelo menos um de R¹, R² ou R³ compreender uma molécula
transportadora.

7. Um ligante dirigido à integrina da fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, caracterizado por
n ser um número inteiro de 1 a 8;

R¹ ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril
substituído facultativamente, um heterociclico substituído

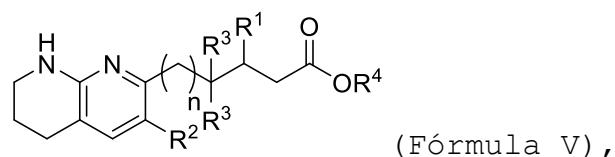
facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R¹ compreender uma molécula transportadora;

R² ser H, um alquil substituído facultativamente ou R² compreender uma molécula transportadora;

R³ ser selecionado de maneira independente a partir do grupo consistindo em H e um alquil substituído facultativamente ou R³ compreender uma molécula transportadora;

R⁴ ser H ou um alquil substituído facultativamente; e onde pelo menos um de R¹, R² ou R³ compreender uma molécula transportadora.

8. Um ligante dirigido à integrina da fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, caracterizado por n ser um número inteiro de 1 a 8;

R¹ ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R¹ compreender uma molécula transportadora;

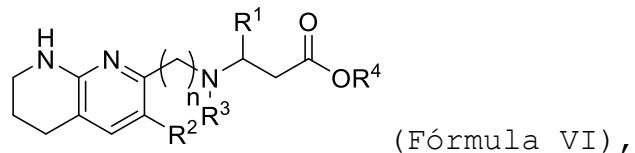
R² ser H, um alquil substituído facultativamente ou R² compreender uma molécula transportadora;

cada instância de R³ ser selecionada de maneira independente a partir do grupo consistindo em H e um alquil substituído facultativamente ou R³ compreender uma molécula transportadora;

R⁴ ser H ou um alquil substituído facultativamente; e

onde pelo menos um de R¹, R² ou R³ compreender uma molécula transportadora.

9. Um ligante dirigido à integrina da fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, caracterizado por
n ser um número inteiro de 1 a 8;

R¹ ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R¹ compreender uma molécula transportadora;

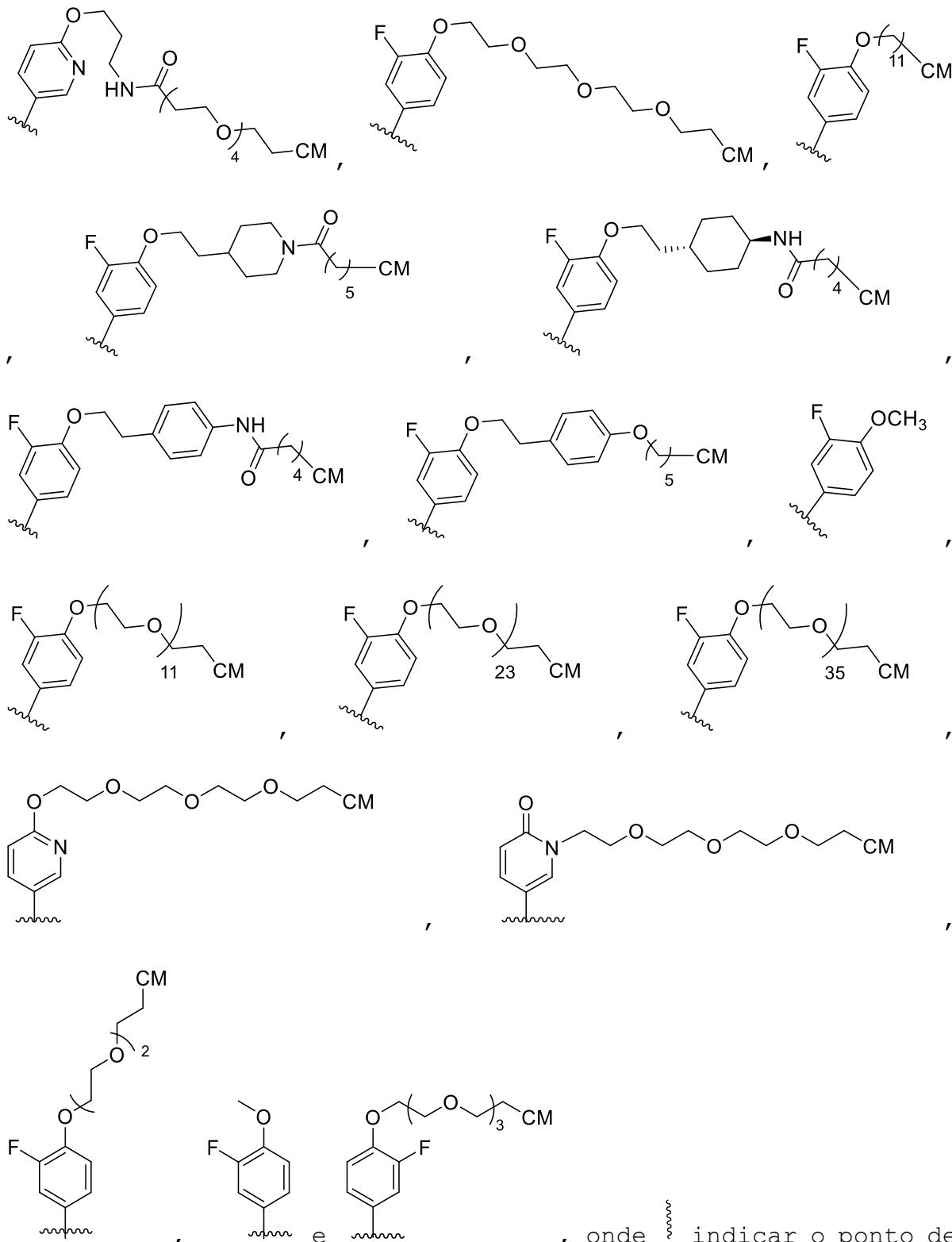
R² ser H, um alquil substituído facultativamente ou R² compreender uma molécula transportadora;

cada instância de R³ ser selecionada de maneira independente a partir do grupo consistindo em H e um alquil substituído facultativamente ou R³ compreender uma molécula transportadora;

R⁴ ser H ou um alquil substituído facultativamente; e

onde pelo menos um de R¹, R² ou R³ compreender uma molécula transportadora.

10. O ligante de direcionamento, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 ou 5-9 caracterizado por R¹ ser selecionado do grupo que consiste em:



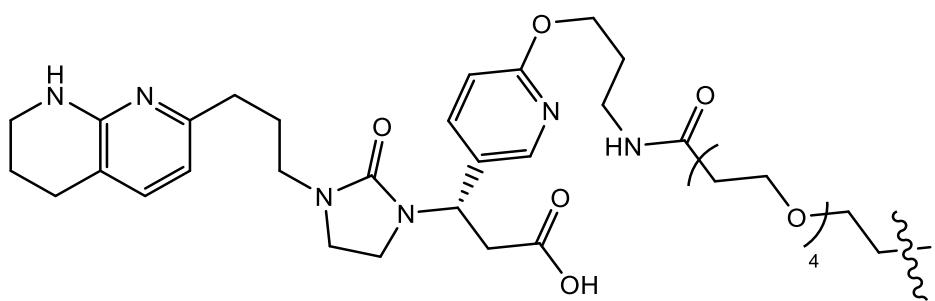
fixação e CM compreender uma molécula transportadora.

11. O ligante dirigido à integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-10, caracterizado pela molécula

transportadora ser um ingrediente farmacêutico ativo ou um pró-fármaco.

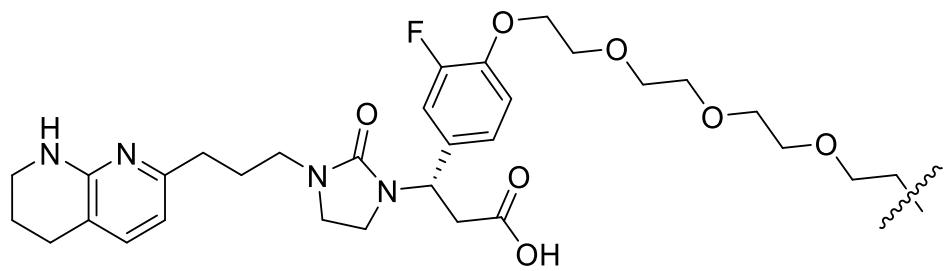
12. O ligante dirigido à integrina, de acordo com a Reivindicação 11, caracterizado pela molécula transportadora compreender uma pequena molécula, um anticorpo, um fragmento de anticorpo, uma imunoglobulina, um anticorpo monoclonal, um rótulo ou marcador, um lipídio, um oligonucleotídio natural ou modificado, um modificado composto à base de oligonucleotídios (por exemplo, um oligonucleotídio antissentido ou um agente de RNAi), um ácido nucleico natural ou modificado, um peptídeo, um aptâmero, um polímero, uma poliamina, uma proteína, uma toxina, uma vitamina, um polietilenoglicol, um hapteno, uma digoxigenina, uma biotina, um átomo ou molécula radioativa ou um fluoróforo

13. Um ligante dirigido à integrina compreendendo uma fórmula selecionada de:



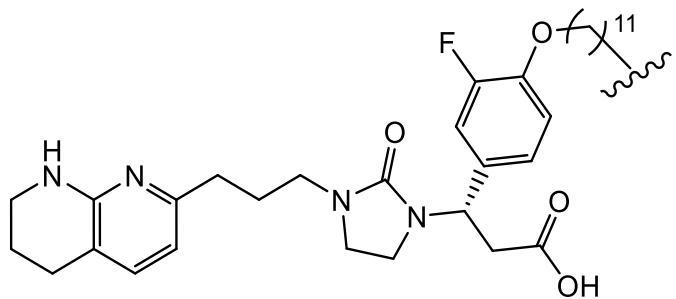
(Estrutura

1a);

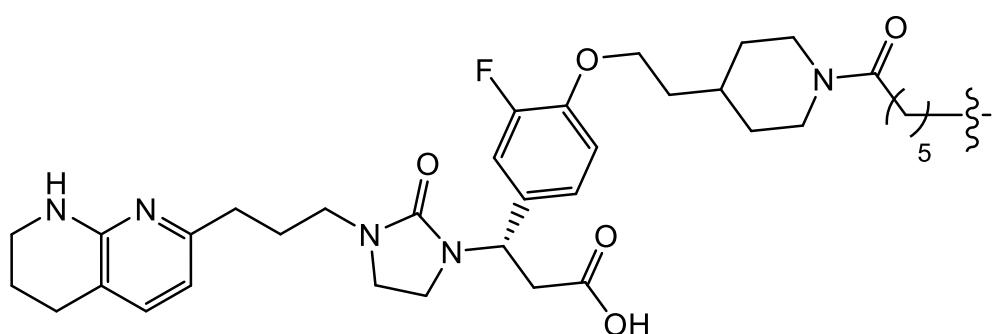


(Estrutura

2a);

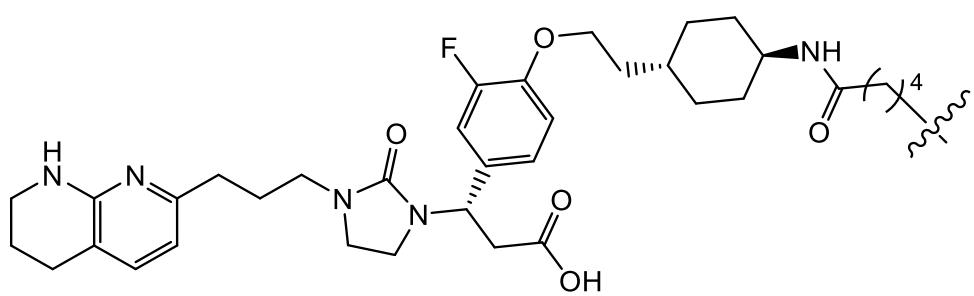


(Estrutura 2.1a);



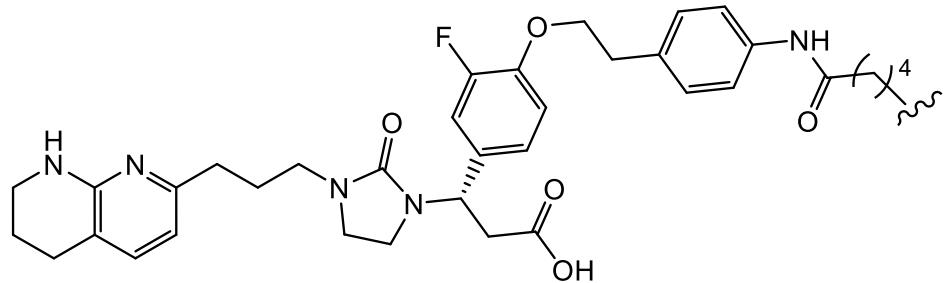
(Estrutura

2.2a);

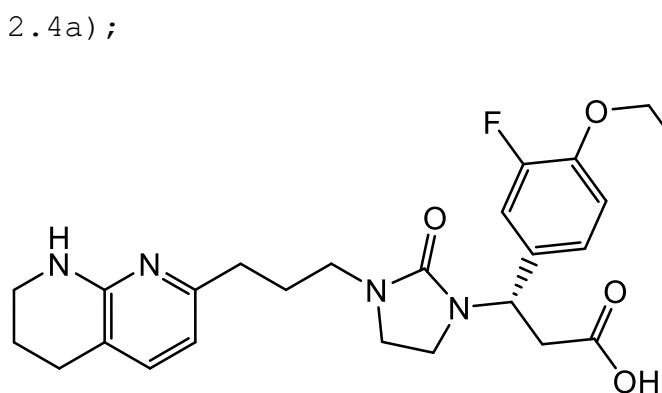


(Estrutura

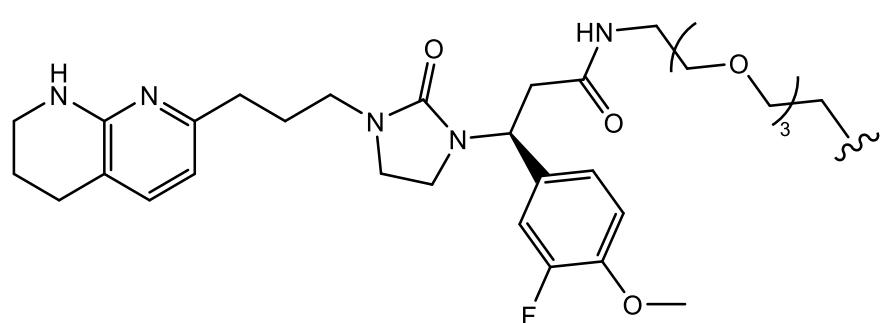
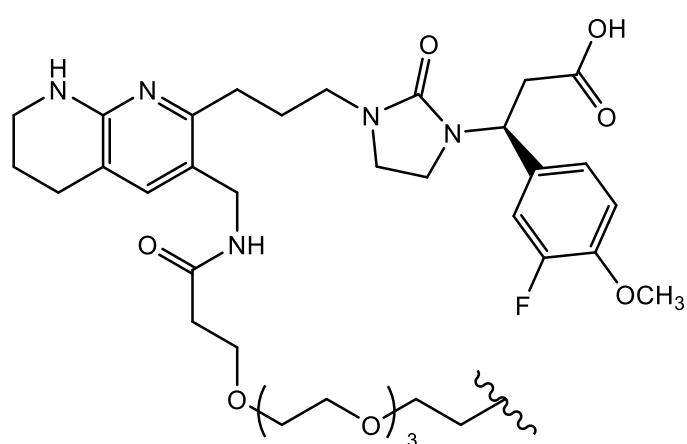
2.3a);

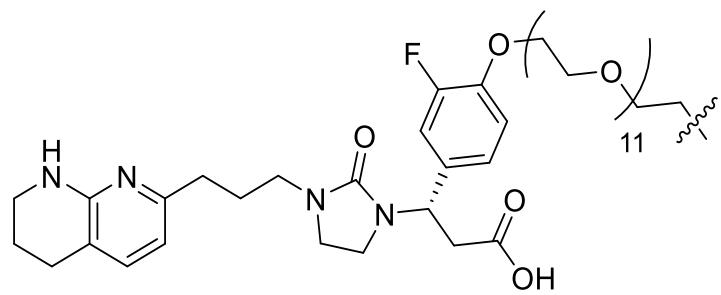


(Estrutura

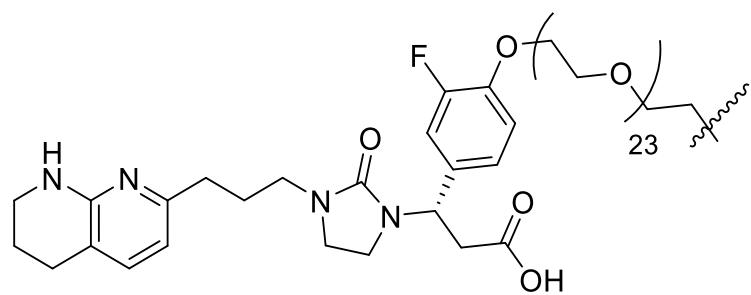


(Estrutura

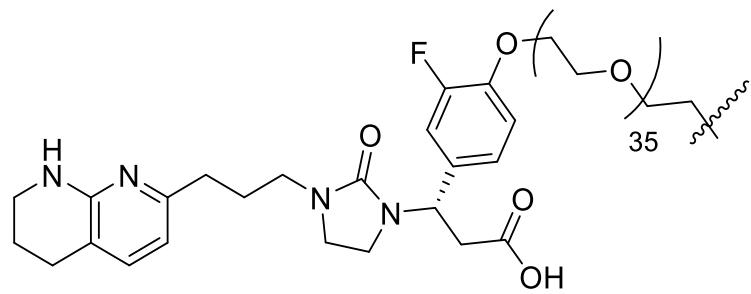




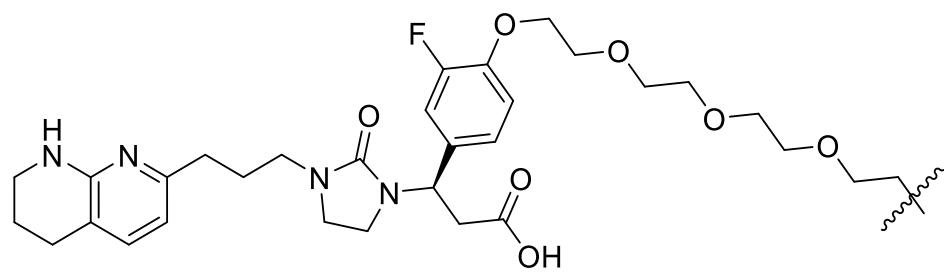
(Estrutura 2.8a);



(Estrutura 2.9a);

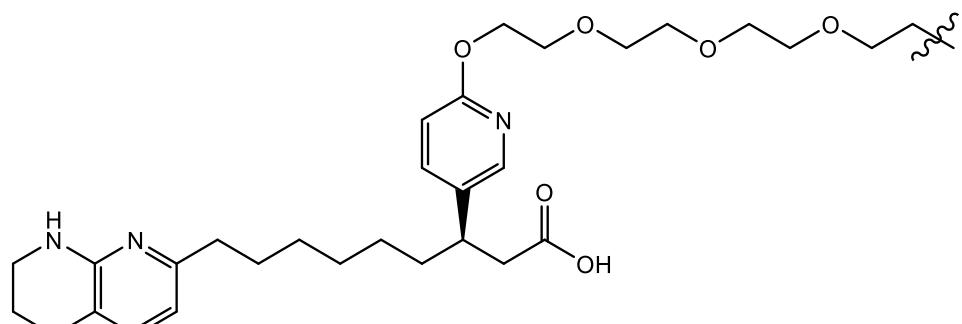


(Estrutura 2.10a);



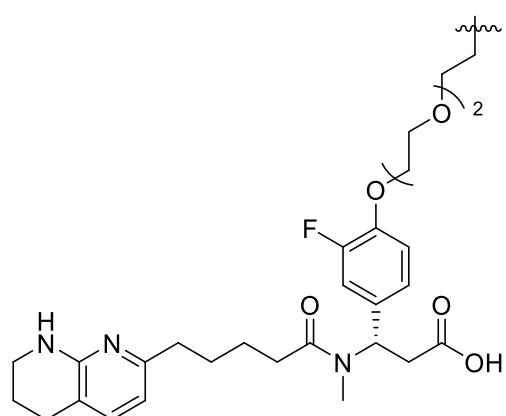
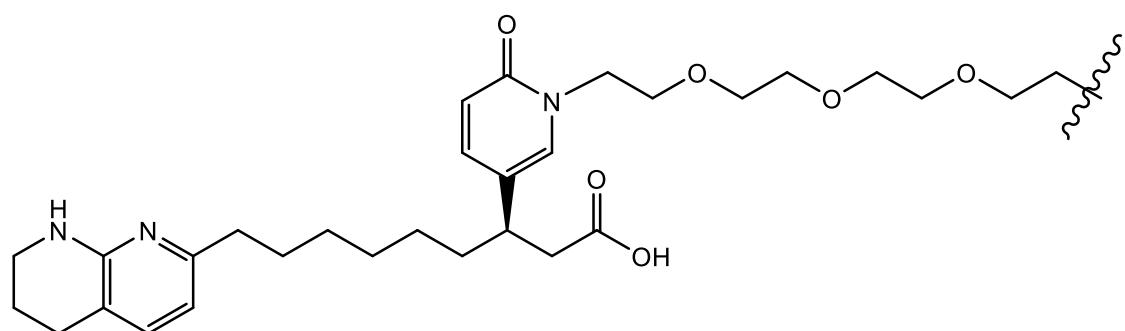
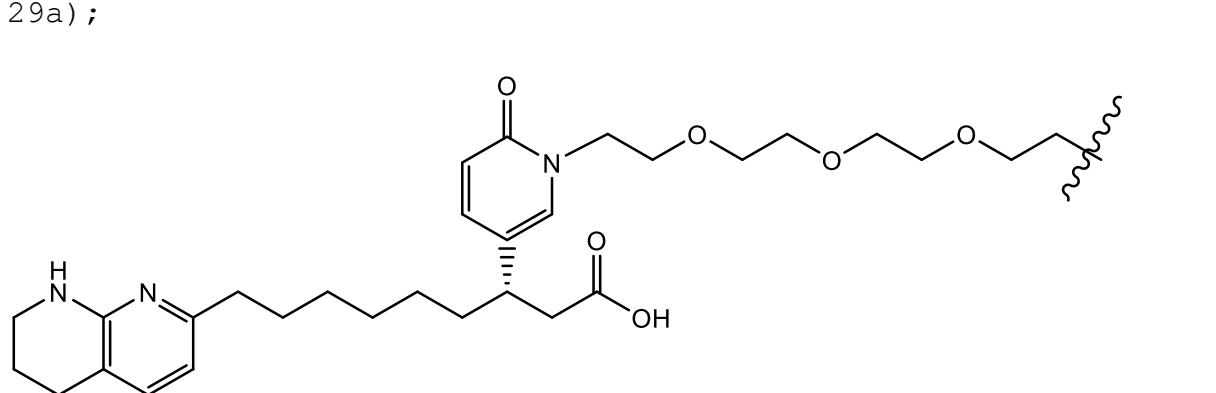
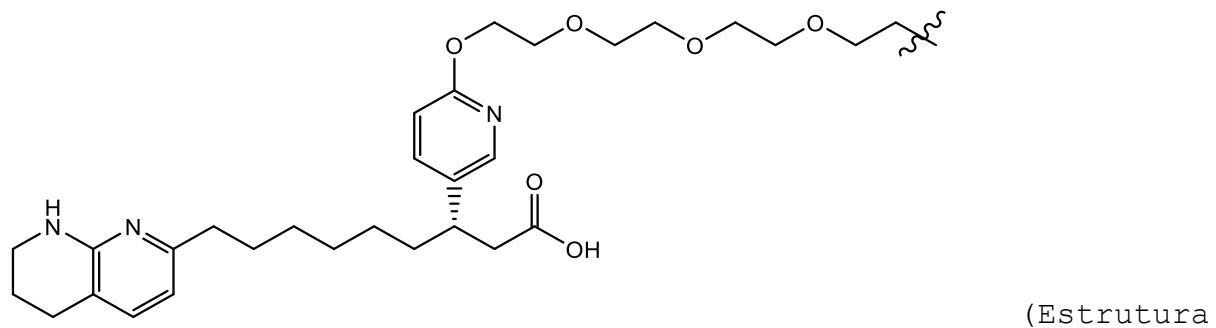
(Estrutura

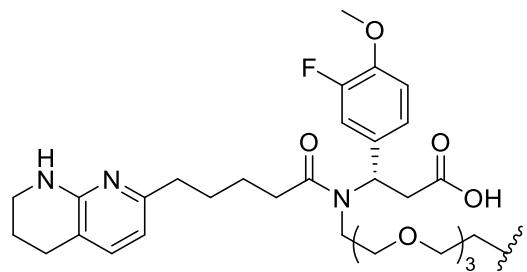
2.11a);



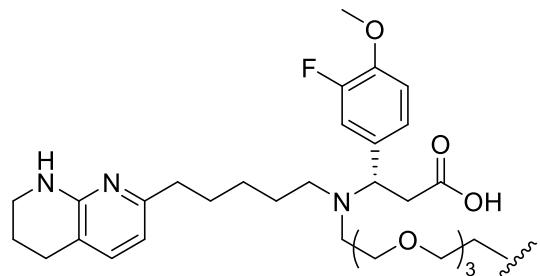
(Estrutura

28a);

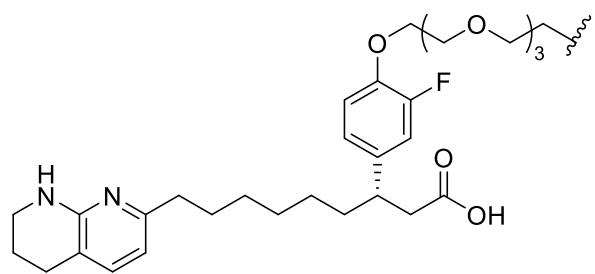




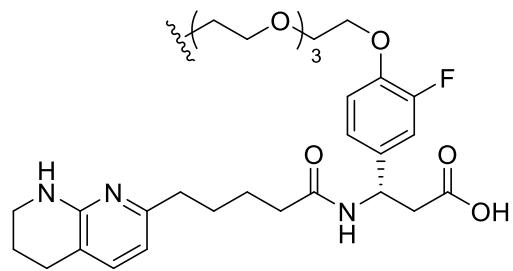
(Estrutura 33a);



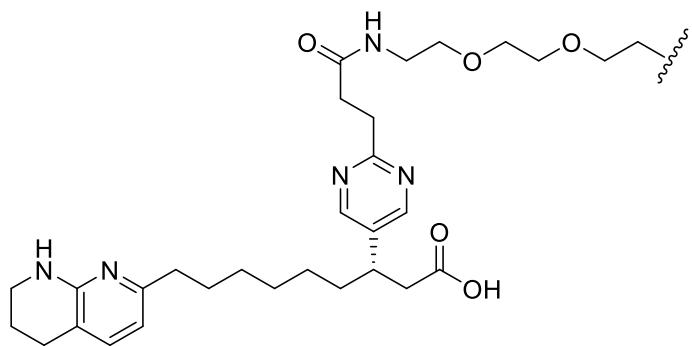
(Estrutura 34a);



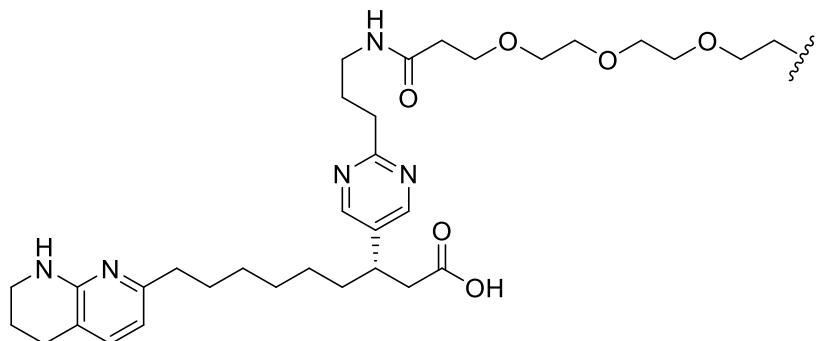
(Estrutura 36a);



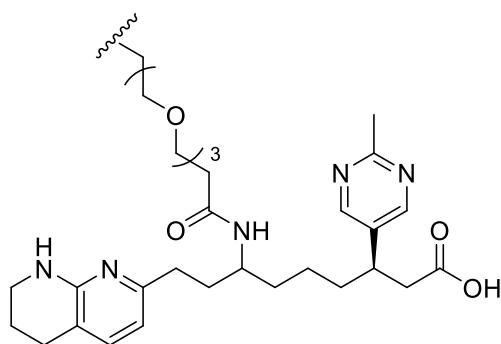
(Estrutura 37a);



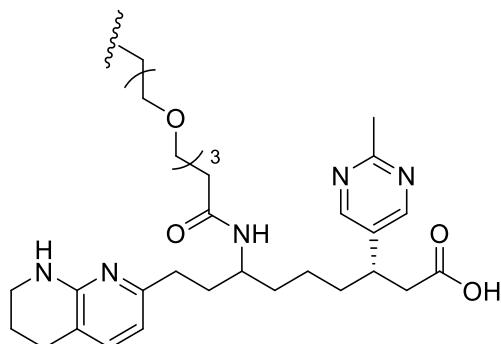
(Estrutura 38a);



(Estrutura 39a);



(Estrutura 40a); e



(Estrutura 41a)

ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, caracterizado por
~ indicar uma conexão a uma parte compreendendo uma molécula transportadora.

14. Um grupo dirigido à integrina compreendendo um ligante dirigido à integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-13, caracterizado pelo grupo dirigido estar em forma monodentada, onde o grupo dirigido à integrina ser conjugado com uma molécula transportadora.

15. Um grupo dirigido à integrina compreendendo um ligante dirigido à integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-13, caracterizado pelo grupo dirigido estar em forma bidentada, onde o grupo dirigido à integrina ser conjugado com uma molécula transportadora.

16. Um grupo dirigido à integrina compreendendo um ligante dirigido à integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-13, caracterizado pelo grupo dirigido estar em forma tridentada, onde o grupo dirigido à integrina ser conjugado com uma molécula transportadora.

17. Um grupo dirigido à integrina compreendendo um ligante dirigido à integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-13, caracterizado pelo grupo dirigido estar em forma tetradentada, onde o grupo dirigido à integrina ser conjugado com uma molécula transportadora.

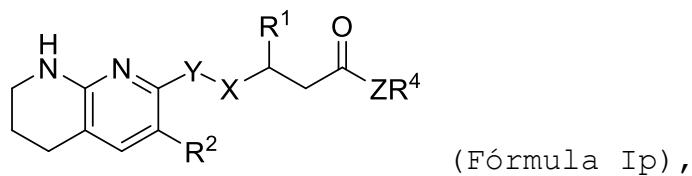
18. O ligante dirigido à integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-13, caracterizado pelo ligante dirigido à

integrina ser conjugado com uma molécula transportadora que compreende um composto com base em nucleotídios.

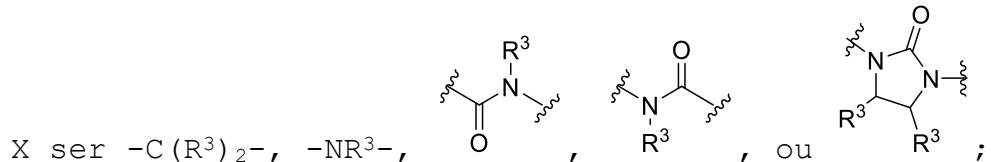
19. O ligante dirigido à integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-13, caracterizado pela molécula transportadora compreender um agente de RNAi.

20. O ligante dirigido à integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-13 compreender adicionalmente um ligante de polietilenoglicol com 2-20 unidade de óxido de etileno.

21. Um precursor do ligante dirigido à integrina da fórmula:



caracterizado por



Y ser um alquíleno substituído facultativamente;

Z ser O, NR³ ou S;

n ser um número inteiro de 1 a 8;

R¹ ser um aril substituído facultativamente, um heteroaril substituído facultativamente, um heterociclico substituído facultativamente, um cicloalquil substituído facultativamente ou R¹ compreender uma molécula transportadora;

R² ser H, um alquil substituído facultativamente ou R² compreender uma molécula transportadora;

cada instância de R³ ser selecionada de maneira independente a partir do grupo consistindo em H e um alquil substituído facultativamente ou R³ compreender uma molécula transportadora;

R⁴ ser H ou um alquil substituído facultativamente; e onde pelo menos um de Y, R¹, R², qualquer instância de R³ e R⁴ compreender um grupo reativo.

22. O precursor de ligante dirigido à integrina, de acordo com a Reivindicação 21, caracterizado pelo grupo de reagente ser uma azida.

23. Um precursor do ligante dirigido à integrina ter a estrutura representada pelo grupo consistindo em: Estrutura 1b, Estrutura 1c, Estrutura 2b, Estrutura 2c, Estrutura 2.1b, Estrutura 2.1c, Estrutura 2.2b, Estrutura 2.2c, Estrutura 2.3b, Estrutura 2.3c, Estrutura 2.4b, Estrutura 2.4c, Estrutura 2.5b, Estrutura 2.5c, Estrutura 2.6b, Estrutura 2.6c, Estrutura 2.7b, Estrutura 2.8c, Estrutura 2.8b, Estrutura 2.8c, Estrutura 2.9b, Estrutura 2.9c, Estrutura 2.10b, Estrutura 2.10c, Estrutura 2.11b, Estrutura 2.11c, Estrutura 28b, Estrutura 28c, Estrutura 29b, Estrutura 29c, Estrutura 30b, Estrutura 30c, Estrutura 31b, Estrutura 31c, Estrutura 32b, Estrutura 32c, Estrutura 33b, Estrutura 33c, Estrutura 34b, Estrutura 34c, Estrutura 36b, Estrutura 36c, Estrutura 37b, Estrutura 37c, Estrutura 38b, Estrutura 38c, Estrutura 39b, Estrutura 39c, Estrutura 40b, Estrutura 40c, Estrutura 41b e Estrutura 41c.

24. Um conjugado compreendendo uma terapia com base em oligonucleotídeos ligados a um ligante dirigido à integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-21.

25. O conjugado, de acordo com a Reivindicação 24, caracterizado pela terapia com base em oligonucleotídeos ser um agente de RNAi.

26. Uma composição compreendendo o ligante de integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-13 ou um grupo de direcionamento, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 14-17 e um excipiente farmaceuticamente aceito.

27. Uma composição compreendendo o ligante dirigido à integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-13 ou um grupo de direcionamento, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 14-17, caracterizada pelo ligante dirigido à integrina ou grupo de direcionamento ser conjugado com um composto com base em oligonucleotídeos que é capaz de inibir a expressão de um gene-alvo em uma célula expressando uma integrina.

28. A composição, de acordo com a Reivindicação 27, caracterizada pelo ligante dirigido à integrina ou grupo de direcionamento ser conjugado com um agente de RNAi que é capaz de inibir a expressão de um gene-alvo em uma célula expressando uma integrina.

29. A composição, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 26-28, caracterizada pela integrina ser integrina $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, ou ambas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$.

30. Um método de entregar uma ou mais moléculas transportadoras para uma célula expressando integrina $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, ou ambas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$, em um participante do estudo, o método compreendendo a administração ao participante de (i) uma composição compreendendo um ligante dirigido à integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-13 ou um grupo de direcionamento, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 14-17, caracterizado pelo ligante dirigido à integrina ou grupo de direcionamento ser conjugado com uma ou mais moléculas transportadoras ou (ii) uma composição, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 26-28.

31. Um método de entregar uma ou mais moléculas transportadoras para uma célula ou tecido de um participante do estudo *in vivo*, o método compreendendo a administração ao participante de (i) uma composição compreendendo um ligante dirigido à integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-13 ou um grupo de direcionamento, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 14-17, caracterizado pelo ligante dirigido à integrina ou grupo de direcionamento ser conjugado com uma ou mais moléculas transportadoras ou (ii) uma composição, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 26-29.

32. O método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 30 ou 31, caracterizado por uma ou mais moléculas transportadoras compreenderem um composto com base em oligonucleotídeos.

33. O método, de acordo com a Reivindicação 32, caracterizado pelo composto com base em oligonucleotídeos ser um agente de RNAi.

34. Um método de inibir a expressão de um gene-alvo em uma célula que expressa a integrina $\alpha v\beta 3$, a integrina $\alpha v\beta 5$ ou ambas as integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$, in vivo, o método compreendendo a administração a um participante do estudo de uma quantidade eficaz de (i) uma composição que inclui um agente de RNAi conjugado com um ligante dirigido à integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-13 ou um grupo de direcionamento, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 14-17 ou (ii) uma composição, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 26-28.

35. O método, de acordo com a Reivindicação 34, caracterizado pelo gene-alvo ser *EPAS1* (*HIF2 alfa*).

36. O método, de acordo com a Reivindicação 34 ou Reivindicação 35, caracterizado pela célula ser uma célula tumorosa de carcinoma renal de células claras.

37. Uso de um ligante dirigido à integrina, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-13 ou um grupo de direcionamento, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 14-17 ou uma composição, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 26-28 para a entrega da molécula transportadora para uma célula compreendendo $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ ou ambos $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$.

38. O uso, de acordo com a Reivindicação 37, caracterizado pela célula ser uma célula renal.

39. O uso da composição, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 26-28 para a produção de um medicamento para o tratamento de uma doença ou transtorno, caracterizado pela doença ou transtorno poderem ser tratados ou melhorados pela entrega de uma molécula transportadora a uma célula compreendendo $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ ou ambos $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$.

RESUMO**LIGANTES DIRIGIDOS À INTEGRINA E SEUS USOS**

São descritos compostos com afinidade por integrinas, a síntese destes compostos e o uso destes compostos como ligantes para facilitar a entrega de moléculas transportadoras a células expressando integrinas. Os ligantes dirigidos à integrina têm estabilidade de soro e afinidade com a integrina $\alpha v\beta 3$ e/ou $\alpha v\beta 5$ e são adequados para conjugação com moléculas transportadoras, como agentes terapêuticos baseados em oligonucleotídeos (p. ex., agentes de RNAi), para facilitar a entrega das moléculas transportadora a células e tecidos, como células tumorosas, que expressam integrina $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ ou ambas as integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$. Também são descritas composições que incluem ligantes dirigidos à integrina e métodos de uso.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 202001228 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 27/10/2020
- Hora de Geração do Código: 11:13:49
- Código de Controle:
 - Campo 1: 51B7532BB5FD946C
 - Campo 2: 8F19BFAC40587481