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

(21) BR 112020009836-1 A2

(22) Data do Depósito: 30/11/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 13/10/2020

(54) Título: PRÓ-DROGAS DE LIGAÇÃO A ALBUMINA DE DERIVADOS DE AURISTATINA E

(51) Int. Cl.: C07K 5/02; A61K 47/64; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 30/11/2017 US 62/592,721.

(71) Depositante(es): CENTURION BIOPHARMA CORPORATION.

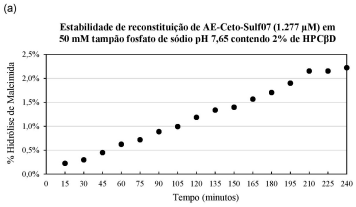
(72) Inventor(es): FELIX KRATZ; KHALID ABU AJAJ; ANNA WARNECKE; FRIEDERIKE I. NOLLMANN; STEPHAN DAVID KOESTER; JAVIER GARCIA FERNANDEZ; LARA PES; HEIDI-KRISTIN WALTER; JOHANNES PALL MAGNUSSON; SERGHEI CHERCHEJA; PATRICIA PEREZ GALAN; FEDERICO MEDDA; STEFFEN JOSEF DAUM.

(86) Pedido PCT: PCT US2018063376 de 30/11/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/108974 de 06/06/2019

(85) Data da Fase Nacional: 15/05/2020

(57) Resumo: A presente divulgação fornece pró-drogas de ligação a albumina de derivados de auristatina E e usos dos mesmos.



“PRÓ-DROGAS DE LIGAÇÃO À ALBUMINA DE DERIVADOS DE AURISTATINA E”

[001] Este pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório U.S. 62/592.721 depositado em 30 de novembro de 2017, cuja divulgação é incorporada por referência neste documento na sua totalidade.

FUNDAMENTO

[002] Drogas anticâncer de baixo peso molecular geralmente têm uma janela terapêutica estreita que limita sua eficácia clínica. Esses compostos de baixo peso molecular mostram uma alta tendência a penetrar nos tecidos do corpo por difusão, resultando em uma biodistribuição uniforme. Portanto, apenas pequenas quantidades da droga chegam ao sítio da ação e, devido à distribuição nos tecidos saudáveis do corpo, essas drogas causam efeitos colaterais problemáticos.

[003] Essas desvantagens são particularmente críticas para as drogas que são altamente citotóxicas e têm uma janela terapêutica muito estreita. Auristatinas são drogas baseadas em peptídeos de ligação à tubulina e exemplos representativos como dolastatina 10, dolastatina 15, auristatina PE, auristatina E ou auristatina F exibem efeitos altamente citotóxicos. Nos ensaios clínicos de fase 1 e 2, a dolastatina 10, a dolastatina 15 e a auristatina PE resultaram em toxicidade sistêmica inaceitável, bem como na falta de atividade antitumoral e, portanto, foram descontinuadas (EA Perez et al., Invest. New Drugs, 23:257-261 (2005); M. von Mehren et al., Sarcoma, 8:107-111 (2004); R.S. Marks et al., Am. J. Clin. Oncol., 26:336-337 (2003)).

[004] A distribuição de drogas em oncologia é uma abordagem que tem o potencial de aumentar o índice terapêutico restrito de agentes altamente citotóxicos. Na maioria dos sistemas de distribuição de drogas, a droga citotóxica é ligada ao transportador através de um espaçador que incorpora um ponto de ruptura predeterminado que permite que a droga ligada seja liberada no sítio alvo celular (F. Kratz et al., ChemMedChem, 3:20-53 (2008)).

[005] A albumina ou seus conjugados de drogas exibem uma meia-vida marcadamente longa na circulação sistêmica de até 19 dias. Uma abordagem especialmente atraente é desenvolver pró-drogas de agentes altamente citotóxicos que se ligam covalentemente à albumina sérica circulante que serve como transportador macromolecular após a administração. Devido a 1.) uma permeabilidade elevada de macromoléculas através das paredes dos vasos de tecido maligno, infectado ou inflamado combinado com um sistema de drenagem linfática intacto e 2.) a expressão de proteínas de ligação à albumina no endotélio do tumor e no interstíciodo tumor, conjugados de drogas de albumina transportam a substância terapeuticamente eficaz para o sítio alvo (isto é, o tumor) onde o agente altamente citotóxico é liberado (US 7.387.771; F. Kratz, J. Control. Release, 132:171-183 (2008); F. Kratz, U. Beyer, Drug Delivery, 5:281-299 (1998)).

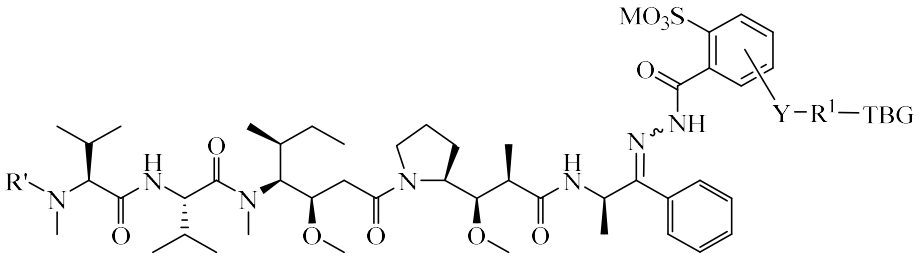
[006] No entanto, ao projetar sistemas de distribuição de drogas com agentes altamente citotóxicos, um equilíbrio crítico deve ser alcançado entre preservar as propriedades de direcionamento do transportador de drogas, permitindo uma liberação controlada da droga citotóxica e evitando sua liberação prematura na circulação sanguínea ou sistemicamente. Os sistemas de distribuição de drogas sensíveis a ácidos devem ter estabilidade suficiente na corrente sanguínea e, no entanto, permitir a liberação eficaz da droga no sítio do tumor de maneira dependente do pH (F. Kratz et al., ChemMedChem, 3:20-53 (2008)).

[007] Para drogas altamente citotóxicas com valores de IC_{50} contra células tumorais na faixa picomolar, como a classe de auristatinas baseadas em peptídeos de baixo peso molecular, que não podem ser administradas devido à sua insolubilidade em água e janela terapêutica muito estreita, é necessário sistemas eficientes de liberação e distribuição de drogas para obter uma liberação e distribuição mais eficazes e controladas dessas drogas altamente potentes. Portanto, a presente divulgação fornece composições farmacêuticas mais eficientes e/ou mais toleráveis

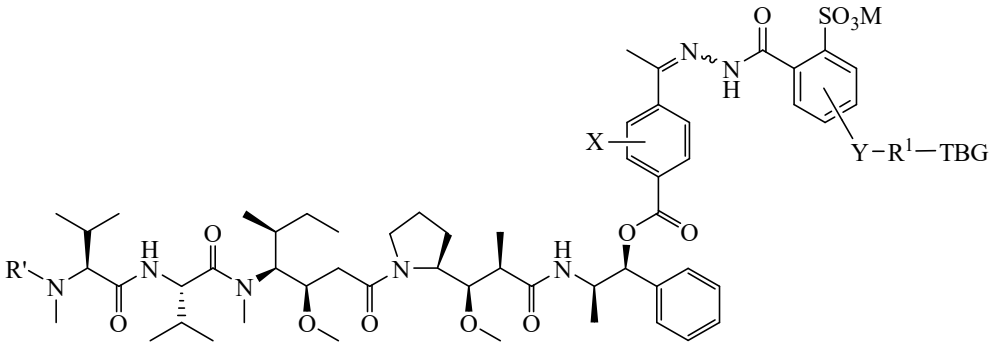
de pró-drogas de ligação à albumina de derivados da auristatina E que podem ser utilizados no tratamento de doenças malignas.

SUMÁRIO

[008] A presente divulgação fornece um composto com a estrutura da Fórmula I ou II:



Fórmula I **nula I**



Fórmula II **mula II**

ou um sal, hidrato, solvato ou isômero farmaceuticamente aceitável do mesmo;

em que:

R' é H ou $–CH_3$,

M é H ou um contra-íon farmaceuticamente aceitável;

Y está ausente ou selecionado de um C_1-C_6 alquil opcionalmente substituído, -NH-C(O)-,

-C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -C(O)-O-, e –O-C(O)-;

R^1 está ausente ou um C_1-C_{18} alquil opcionalmente substituído em que opcionalmente até seis átomos de carbono no referido C_1-C_{18} alquil são substituídos

independentemente por -OCH_2CH_2-;

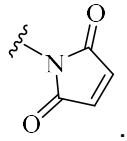
X é H ou selecionado de halogênio (por exemplo, -F, -Cl, -Br ou-I), -NO_2, -NR^2R^3, -OR^2, -NHCOR^2 e -OCOR^2, em que R^2 e R^3 são cada um deles selecionados independentemente de H e C_1-C_4 alquil;

TBG é um grupo de ligação ao tiol selecionado de um grupo maleimida opcionalmente substituído, um grupo haloacetamida opcionalmente substituído, um grupo haloacetato opcionalmente substituído, um grupo piridiltio opcionalmente substituído, um grupo isotiocianato opcionalmente substituído, um grupo vinilcarbonil opcionalmente substituído, um grupo vinilcarbonil opcionalmente substituído, um grupo aziridina opcionalmente substituído, um grupo dissulfeto opcionalmente substituído e um grupo acetileno opcionalmente substituído.

[009] Em algumas modalidades, R’ é -CH_3. Em outras modalidades, R' é H.

[010] Em algumas modalidades, TBG é selecionado de um grupo maleimida opcionalmente substituído.

[011] Em algumas modalidades, TBG é um grupo maleimida da fórmula:



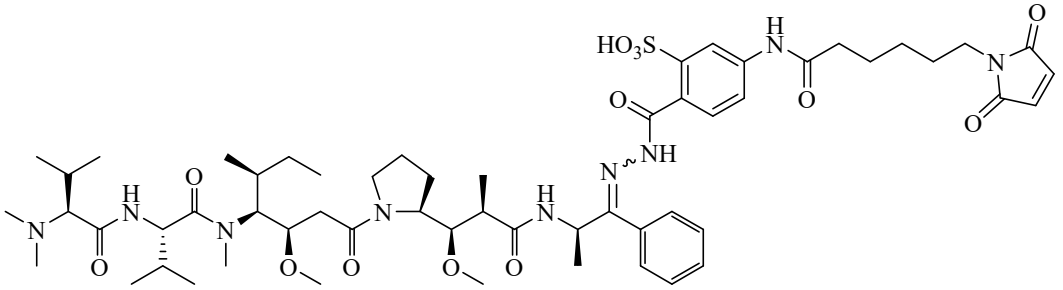
.

[012] Em algumas modalidades, Y é -NH-C(O)-.

[013] Em algumas modalidades, M é H^+ ou Na^+.

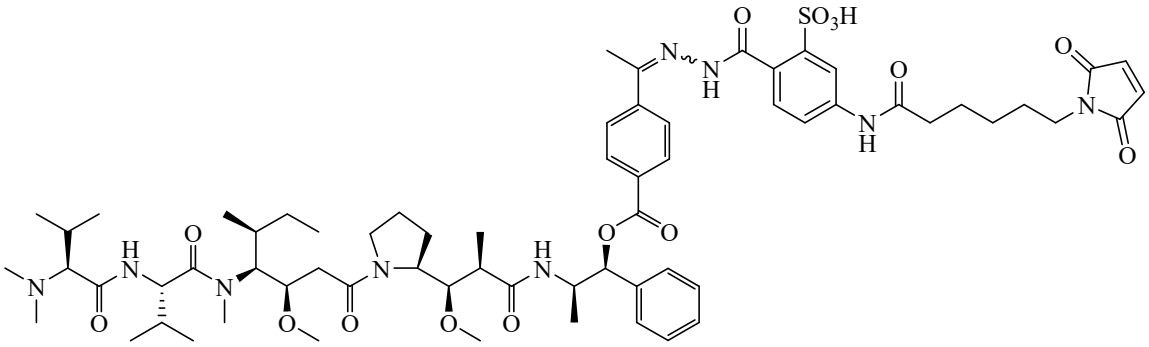
[014] Em algumas modalidades, R^1 é um C_1-C_5 alquil opcionalmente substituído. Em outras modalidades, R^1 é C_1-C_5 alquil.

[015] Em algumas modalidades, a divulgação fornece um composto com a estrutura da Fórmula III:



Fórmula III

[016] Em outras modalidades, a divulgação fornece um composto com a estrutura da Fórmula IV:



Fórmula IV

.

[017] A presente divulgação também fornece uma composição farmacêutica compreendendo um composto como aqui divulgado e um transportador farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, o transportador farmaceuticamente aceitável é selecionado de um ou mais de um agente solubilizante, um agente encapsulante e um lioprotetor. Em outras modalidades, o transportador farmaceuticamente aceitável compreende um ou mais de dimetil-β-ciclodextrina, hidroxietil-β-ciclodextrina, hidroxipropil-β-ciclodextrina e trimetil-β-ciclodextrina.

[018] Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é adequada para administração intravenosa. Em algumas modalidades, a composição, quando administrada por via intravenosa a um paciente, se liga covalentemente de maneira seletiva e rápida *in situ* à albumina endógena na circulação sanguínea. Em outras modalidades, a composição, quando administrada por via intravenosa a um paciente,

se liga covalentemente de maneira seletiva e rápida *in situ* a um grupo tiol de cisteína-34 de albumina endógena na circulação sanguínea.

[019] A presente divulgação também fornece um método para tratar um paciente que sofre de uma doença selecionada de um câncer, uma doença viral, uma doença autoimune, uma doença inflamatória aguda ou crônica e uma doença causada por bactérias, fungos e outros micro-organismos, compreendendo administrar ao paciente em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto ou uma composição farmacêutica como aqui descrito. Em algumas modalidades, a doença é câncer e é selecionada de carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiplo e melanoma. Em algumas modalidades, a administração é administração intravenosa.

[020] A presente divulgação também fornece um método para reduzir a citotoxicidade de um composto que compreende administrar um composto ou uma composição farmacêutica como aqui divulgado a um paciente em necessidade do mesmo, em que a administração resulta em uma redução na citotoxicidade quando comparada a uma dose equivalente de agente ativo não modificado.

[021] A presente divulgação fornece ainda um método para aumentar a concentração de um metabólito de um composto em um tumor, compreendendo administrar um composto ou uma composição farmacêutica como divulgado aqui a um paciente em necessidade do mesmo, em que o aumento é comparado a uma dose equivalente de agente ativo não modificado.

[022] A presente divulgação fornece um composto como aqui divulgado para uso como um medicamento.

[023] A presente divulgação também fornece um composto como aqui divulgado para uso no tratamento de uma doença ou condição selecionada do grupo que consiste em um câncer, uma doença viral, doença autoimune, doença inflamatória aguda ou crônica e uma doença causada por bactérias, fungos ou outros micro-

organismos.

[024] A presente divulgação fornece ainda o uso de um composto ou uma composição como aqui divulgado na preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou condição selecionada de um câncer, uma doença viral, uma doença autoimune, uma doença inflamatória aguda ou crônica e uma doença causada por bactérias, fungos ou outros micro-organismos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[025] A Figura 1 compara a estabilidade de AE-Ceto-Sulf07 (Painel (a)) e AE-Ceto-EMCH (Painel (b)) no tampão de reconstituição (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,65, sacarose 5% (p/v) e 2% de 2-hidroxipropil-ciclodextrinaβ(2-HPβCD (p/v)).

[026] A Figura 2 compara a estabilidade de AE-Éster-Sulf07 (Painel (a)) e AE-Éster-EMCH (Painel (b)) no tampão de reconstituição (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,65, sacarose 5% (p/v) e 4% de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (2-HPβCD, (p/v)).

[027] A Figura 3 mostra a conjugação de AE-Ceto-Sulf07 com albumina no plasma humano.

[028] A Figura 4 mostra a conjugação de AE-Éster-Sulf07 com albumina no plasma humano.

[029] A Figura 5 mostra a cinética de ligação de AE-Ceto-Sulf07 à albumina no plasma humano.

[030] A Figura 6 mostra a cinética de ligação de AE-Ceto-Sulf07 à albumina no plasma murino.

[031] A Figura 7 mostra a cinética de ligação de AE-Ceto-Sulf07 à albumina no plasma de rato.

[032] A Figura 8 mostra a cinética de ligação de AE-Éster-Sulf07 à albumina no plasma humano.

[033] A Figura 9 mostra a cinética de ligação de AE-Éster-Sulf07 à albumina no plasma murino até que o limite de quantificação (LOQ) fosse atingido para a droga.

[034] A Figura 10 mostra a cinética de ligação de AE-Éster-Sulf07 à albumina no plasma de ratos até que o LOQ fosse atingido pela droga.

[035] A Figura 11 mostra a liberação dependente de pH do AE-Ceto (pH 7,4 (Painel (a) e pH 4,1 (Painel (b))) do AE-Ceto-Sulf07 ligado à albumina humana.

[036] A Figura 12 mostra a liberação dependente de pH do AE-Éster (pH 7,4 (Painel (a) e pH 4,1 (Painel (b))) do AE-Éster-Sulf07 ligado à albumina humana.

[037] A Figura 13 mostra o efeito antitumoral da auristatina E e AE-Ceto-Sulf07, em comparação com o grupo controle no modelo de câncer de melanoma maligno A375, média do volume de tumor inicial médio ~ 134 mm^3.

[038] A Figura 14 mostra o efeito antitumoral da auristatina E e AE-Ceto-Sulf07, em comparação com o grupo controle no modelo de câncer de melanoma maligno A375, média do volume de tumor inicial médio ~ 332 mm^3.

[039] A Figura 15 mostra o efeito antitumoral da auristatina E e AE-Ceto-Sulf07, em comparação ao grupo controle no modelo de xenoenxerto NSCLC LXFA737, média do volume de tumor inicial médio ~ 132 mm^3.

[040] A Figura 16 mostra o efeito antitumoral da auristatina E e AE-Ceto-Sulf07, em comparação com o grupo controle no modelo de xenoenxerto NSCLC LXFA737, média do volume de tumor inicial médio ~ 330 mm^3.

[041] A Figura 17 mostra o efeito antitumoral da auristatina E e AE-Ceto-Sulf07, em comparação com o grupo controle no carcinoma ovariano humano modelo A2780, média do volume de tumor inicial médio ~ 148 mm^3.

[042] A Figura 18 mostra o efeito antitumoral da auristatina E e AE-Ceto-Sulf07, em comparação ao grupo controle no carcinoma ovariano humano modelo A2780, média do volume de tumor inicial médio ~ 351 mm^3.

[043] A Figura 19 mostra o efeito antitumoral da auristatina E e AE-Éster-Sulf07, em comparação com o grupo controle no modelo de câncer de células renais RXF631, volume de tumor inicial ~ 140 mm^3.

[044] A Figura 20 mostra o efeito antitumoral da auristatina E e AE-Éster-Sulf07, em comparação com o grupo controle no modelo de câncer de melanoma maligno A375, média do volume de tumor inicial médio ~ 332 mm^3.

[045] A Figura 21 mostra o efeito antitumoral da auristatina E e AE-Éster-Sulf07, em comparação ao grupo controle no modelo de xenoenxerto NSCLC LXFA737, média do volume de tumor inicial médio ~ 132 mm^3.

[046] A Figura 22 mostra o efeito antitumoral da auristatina E e AE-Éster-Sulf07, em comparação ao grupo controle no carcinoma ovariano humano modelo A2780, volume de tumor inicial ~ 351 mm^3.

[047] A Figura 23 mostra o efeito antitumoral de AE-Éster-Sulf07, em comparação com o grupo controle no carcinoma ovariano humano modelo A2780, volume de tumor inicial ~ 148 mm^3.

[048] A Figura 24 mostra a degradação acelerada de formulações liofilizadas de auristatina como uma comparação da estabilidade de AE-Ceto-Sulf07 e AE-Ceto-EMCH.

[049] A Figura 25 mostra a degradação acelerada de formulações liofilizadas de auristatina como uma comparação da estabilidade de AE-Éster-Sulf07 e AE-Éster-EMCH.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[050] A menos que definidos de outra forma, os termos científicos e técnicos neste pedido utilizados têm os significados que são vulgarmente entendidos pelos versados na técnica. Geralmente, a nomenclatura relacionada a técnicas de química, biologia molecular, biologia celular e de câncer, imunologia, microbiologia, farmacologia e química de proteínas, aqui descritas, são aquelas bem conhecidas e comumente usadas na técnica.

[051] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente publicados referidos neste pedido de patente são aqui especificamente incorporados por

referência. Em caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo suas definições específicas, servirá de base para controle. A menos que especificado de outra forma, deve ser entendido que cada modalidade divulgada neste documento pode ser usada sozinha ou em combinação com qualquer uma ou mais outras modalidades divulgadas neste documento.

Definições

[052] Em todo esse relatório descritivo, a palavra "compreende" ou variações como "compreende" ou "compreendendo" serão entendidas como implicando a inclusão de um número inteiro declarado (ou componentes) ou grupo de números inteiros (ou componentes), mas não a exclusão de qualquer outro número inteiro (ou componentes) ou grupo de números inteiros (ou componentes).

[053] Ao longo do pedido, onde um composto ou composição é descrito como tendo, incluindo ou compreendendo componentes específicos, é contemplado que esse composto ou composição também possa consistir essencialmente em, ou consistir nos componentes citados. Da mesma forma, onde métodos ou processos são descritos como tendo, incluindo ou compreendendo etapas de processo específicas, os processos também podem consistir essencialmente em, ou consistir nas, etapas de processamento recitadas. Além disso, deve ser entendido que a ordem das etapas ou ordem para executar determinadas ações é imaterial, desde que os compostos, composições e métodos descritos neste documento permaneçam operacionais. Além disso, duas ou mais etapas ou ações podem ser conduzidas simultaneamente.

[054] As formas singulares "um", "uma", e "o/a" incluem os plurais, a menos que o contexto dite claramente o contrário.

[055] O termo "incluindo" é usado para significar "incluindo, mas não limitado a". "Incluindo" e "incluindo, mas não limitado a" são usados de forma intercambiável.

[056] O termo "ou", como utilizado neste documento, deve ser entendido como

"e/ou", a menos que o contexto indique claramente o contrário.

[057] Os termos "droga", "agente", "agente terapêutico", "agente terapeuticamente ativo", "agente ou droga citotóxica", "agente ou droga altamente citotóxica" ou "substância terapeuticamente eficaz" são usados para significar qualquer composto que traga um efeito farmacológico por si só ou após sua conversão no organismo em questão e, portanto, também inclui os derivados dessas conversões. O efeito farmacológico das drogas da composição de acordo com a presente divulgação pode ser apenas um efeito único, por exemplo, um efeito citostático e/ou citotóxico, ou um amplo espectro farmacológico de ações, como um efeito imunossupressor e antiflogístico ao mesmo tempo.

[058] Os termos "paciente", "sujeito" ou "indivíduo" são usados de forma intercambiável e se referem a um animal humano ou não humano. Esses termos incluem mamíferos como humanos, primatas, animais de criação (por exemplo, bovinos, suínos), animais de companhia (por exemplo, caninos, felinos) e roedores (por exemplo, camundongos e ratos). Em certas modalidades, o paciente ou sujeito é um paciente ou sujeito humano, tal como um paciente humano que tem uma condição que precisa de tratamento.

[059] O termo "composição farmacêutica" refere-se a uma composição adequada para uso farmacêutico em um animal sujeito, incluindo seres humanos e mamíferos, por exemplo, combinada com um ou mais veículos, excipientes ou solventes farmaceuticamente aceitáveis. Essa composição também pode conter diluentes, cargas, sais, tampões, estabilizadores, solubilizadores, protetores e outros materiais bem conhecidos na técnica. Em certas modalidades, uma composição farmacêutica abrange uma composição compreendendo o(s) ingrediente(s) ativo(s) e o(s) ingrediente(s) inerte(s) que compõem o excipiente, transportador ou diluente, bem como qualquer produto que resulte, direta ou indiretamente, da combinação, complexação ou agregação de quaisquer dois ou mais dos ingredientes, ou da

dissociação de um ou mais dos ingredientes, ou de outros tipos de reações ou interações de um ou mais dos ingredientes. Por conseguinte, as composições farmacêuticas da presente divulgação abrangem qualquer composição feita misturando um composto da divulgação e um ou mais excipiente(s) farmaceuticamente aceitável(is), transportador(es) e/ou diluente(s).

[060] O termo "transportador farmaceuticamente aceitável" refere-se a um transportador não tóxico que pode ser administrado a um paciente, juntamente com uma substância terapeuticamente eficaz divulgada neste documento, e que não destrói a atividade farmacológica do agente. O termo "excipiente" refere-se a um aditivo em uma formulação ou composição que não é um ingrediente farmaceuticamente ativo. Em certas modalidades, uma substância "farmaceuticamente aceitável" é adequada para uso em contato com células, tecidos ou órgãos de animais ou seres humanos sem toxicidade, irritação, resposta alérgica, imunogenicidade ou outras reações adversas excessivas, na quantidade usada na forma de dosagem de acordo com o esquema de dosagem e proporcional a uma razão benefício/risco razoável. Em certas modalidades, uma substância "farmaceuticamente aceitável" que é um componente de uma composição farmacêutica é, além disso, compatível com o(s) outro(s) ingrediente(s) da composição. Em certas modalidades, os termos "excipiente farmaceuticamente aceitável", "transportador farmaceuticamente aceitável" e "diluente farmaceuticamente aceitável" abrangem, sem limitação, ingredientes inativos, materiais, composições e veículos farmaceuticamente aceitáveis, como enchedores líquidos, enchedores sólidos, diluentes, excipientes, transportadores, solventes e materiais de encapsulamento. Transportadores, diluentes e excipientes também incluem todos os meios de dispersão farmaceuticamente aceitáveis, revestimentos, tampões, agentes isotônicos, estabilizadores, retardantes de absorção, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, adjuvantes, etc. Exceto na medida em que

qualquer excipiente, transportador ou diluente convencional é incompatível com o ingrediente ativo, a presente divulgação abrange o uso de excipientes, transportadores e diluentes convencionais em composições farmacêuticas. Ver, por exemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., Lippincott Williams & Wilkins (Philadelphia, Pennsylvania, 2005); Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th Ed., Rowe et al., Eds., The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association (2005); Handbook of Pharmaceutical Additives, 3rd Ed., Ash and Ash, Eds., Gower Publishing Co. (2007); and Pharmaceutical Preformulation and Formulation, Gibson, Ed., CRC Press LLC (Boca Raton, Florida, 2004).

[061] Os termos "quantidade farmaceuticamente eficaz", "quantidade terapeuticamente eficaz" ou "dose terapeuticamente eficaz" se referem a uma quantidade eficaz para tratar uma doença em um paciente, por exemplo, efetuando uma alteração benéfica e/ou desejável na saúde geral de um paciente sofrendo de uma doença (por exemplo, câncer), tratamento, cura, inibição ou melhoria de uma resposta ou condição fisiológica, etc. O efeito terapêutico completo não ocorre necessariamente pela administração de uma dose, e pode ocorrer somente após a administração de uma série de doses. Assim, uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações. A quantidade eficaz precisa necessária para um sujeito dependerá, por exemplo, do tamanho, saúde e idade do sujeito, natureza e extensão da doença, terapêutica ou combinação de terapêutica selecionada para administração e modo de administração. O trabalhador qualificado pode determinar prontamente a quantidade eficaz para uma dada situação por experimentação de rotina. O profissional versado reconhecerá que o tratamento do câncer inclui, mas não se limita a, matar células cancerígenas, impedir o crescimento de novas células cancerígenas, causar regressão do tumor (uma diminuição no tamanho do tumor), causar uma diminuição nas metástases, melhorar as funções vitais de um paciente, melhorar o bem-estar do paciente, diminuir a dor,

melhorar o apetite, melhorar o peso do paciente e qualquer combinação dos mesmos. Os termos "quantidade farmaceuticamente eficaz", "quantidade terapeuticamente eficaz" ou "dose terapeuticamente eficaz" também se referem à quantidade necessária para melhorar os sintomas clínicos de um paciente. Os métodos terapêuticos ou métodos de tratamento do câncer aqui descritos não devem ser interpretados ou limitados à "cura" do câncer.

[062] Como utilizado neste documento, o termo "tratar" ou "tratamento" inclui reverter, reduzir ou interromper os sintomas, sinais clínicos e patologia subjacente de uma condição de maneira a melhorar ou estabilizar a condição de um sujeito. Como utilizado neste documento e bem entendido na técnica, “tratamento” é uma abordagem para obter resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos. Os resultados clínicos benéficos ou desejados podem incluir, entre outros, alívio, melhoria ou retardo na progressão de um ou mais sintomas ou condições associadas a uma condição, por exemplo, câncer, diminuição da extensão da doença, estado da doença estabilizado (isto é, não piora), atraso ou retardo na progressão da doença, melhoria ou paliação do estado da doença e remissão (parcial ou total), detectável ou indetectável. “Tratamento” também pode significar prolongar a sobrevida, em comparação com a sobrevida esperada se não receber o tratamento. Resultados clínicos benéficos exemplificativos são descritos aqui.

[063] "Administrar" ou "administração de" uma substância, um composto ou um agente a um sujeito pode ser realizada usando um de uma variedade de métodos conhecidos pelos versados na técnica. Por exemplo, um composto ou um agente pode ser administrado por via intravenosa, arterial, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutânea, ocular, sublingual, oral (por ingestão), intranasal (por inalação), intra-espinhal, intracerebral e transdérmica (por absorção, *por exemplo*, através de um ducto cutâneo). Um composto ou agente também pode ser adequadamente introduzido por dispositivos poliméricos recarregáveis ou

biodegradáveis ou outros dispositivos, *por exemplo*, adesivos e bombas ou formulações, que proporcionam a liberação prolongada, lenta ou controlada do composto ou agente. A administração também pode ser realizada, por exemplo, uma vez, uma pluralidade de vezes e/ou por um ou mais períodos prolongados. Em alguns aspectos, a administração inclui administração direta, incluindo auto-administração e administração indireta, incluindo o ato de prescrever uma droga. Por exemplo, como utilizado neste documento, um médico que instrui um paciente a auto-administrar uma droga ou a administrar a droga por outro e/ou que fornece a um paciente uma prescrição de uma droga está administrando a droga ao paciente. Quando um método faz parte de um regime terapêutico que envolve mais de um agente ou modalidade de tratamento, a divulgação contempla que os agentes podem ser administrados no mesmo ou em momentos diferentes e por meio das mesmas ou diferentes vias de administração. Os métodos apropriados de administração de uma substância, um composto ou um agente a um sujeito também dependerão, por exemplo, da idade do sujeito, se o sujeito está ativo ou inativo no momento da administração, se o sujeito é cognitivamente prejudicado no momento da administração, da extensão do comprometimento e das propriedades químicas e biológicas do composto ou agente (*por exemplo* , solubilidade, digestibilidade, biodisponibilidade, estabilidade e toxicidade).

[064] O termo "substituído" refere-se a frações com substituintes que substituem um hidrogênio em um ou mais carbonos da espinha dorsal de um composto químico. Será compreendido que "substituição" ou "substituído por" inclui a condição implícita de que tal substituição está de acordo com a valência permitida do átomo substituído e do substituinte, e que a substituição resulta em um composto estável, por exemplo, que não sofre espontaneamente transformação, como por rearranjo, ciclização, eliminação, etc. Como utilizado neste documento, o termo "substituído" é contemplado para incluir todos os substituintes permissíveis de

compostos orgânicos, a menos que indicado de outro modo. Em um aspecto amplo, os substituintes permissíveis incluem substituintes acíclicos e cíclicos, ramificados e não ramificados, carbocíclicos e heterocíclicos, aromáticos e não aromáticos de compostos orgânicos. Os substituintes permissíveis podem ser um ou mais e os mesmos ou diferentes para compostos orgânicos apropriados. Para os propósitos da divulgação, os heteroátomos, tais como nitrogênio podem ter substituintes de hidrogênio e/ou quaisquer substituintes admissíveis de compostos orgânicos descritos neste documento, os quais satisfazem as valências dos heteroátomos. Substituintes podem incluir quaisquer substituintes aqui descritos, por exemplo, um halogênio, um hidroxil, um carbonil (como um carboxil, um alcoxicarbonil, um formil ou um acil), um tiocarbonil (como um tioéster, um tioacetato ou um tioformato), um alcoxil, um alquiltio, um aciloxi, um fosforil, um fosfato, um fosfonato, um amino, um amido, uma amidina, uma imina, um ciano, um nitro, um azido, um sulfidril, um alquiltio, um sulfato, uma sulfonato, um sulfamoil, um sulfonamido, um sulfonil, um heterociclil, um aralquil, ou uma fração aromática (por exemplo, C_6-C_{12} aril) ou heteroaromática (por exemplo, heteroaril).

[065] “Opcional” ou “opcionalmente” significa que a circunstância descrita posteriormente pode ou não ocorrer, de modo que o pedido inclua casos em que a circunstância ocorre e casos em que não ocorre. Por exemplo, a frase "opcionalmente substituído" significa que um substituinte não hidrogênio pode ou não estar presente em um determinado átomo e, portanto, o pedido inclui estruturas em que um substituinte não hidrogênio está presente e estruturas em que um não hidrogênio substituinte não está presente.

[066] A menos que seja especificamente indicado como "não substituído", entende-se que as referências a frações químicas aqui incluídas incluem variantes substituídas. Por exemplo, a referência a um grupo ou fração "alquil" inclui implicitamente variantes substituídas e não substituídas. Exemplos de substituintes

em frações químicas incluem, mas não estão limitados a, fração halogênio, hidroxil, carbonil (como carboxil, alcoxicarbonil, formil ou acil), tiocarbonil (como tioéster, tioacetato ou tioformato), alcoxil, alquiltio, aciloxi, fosforil , fosfato, fosfonato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfidril, alquiltio, sulfato, sulfonato, sulfamoil, sulfonamido, sulfonil, heterociclil, aralquil ou aril ou heteroaril.

[067] "Aril" indica um anel de carbono aromático com o número indicado de átomos de carbono, por exemplo, 6 a 12 ou 6 a 10 átomos de carbono, no anel. Os grupos aril podem ser monocíclicos ou policíclicos (*por exemplo*, bicíclicos, tricíclicos). Em alguns casos, os dois anéis de um grupo aril policíclico são aromáticos (*por exemplo*, naftil). Em outros casos, os grupos aril policíclicos podem incluir um anel não aromático (*por exemplo*, cicloalquil, cicloalquenil, heterocicloalquil, heterocicloalquenil) fundido a um anel aromático, desde que o grupo aril policíclico esteja ligado à estrutura parental através de um átomo no anel aromático. Assim, um grupo 1,2,3,4-tetra-hidronaftalen-5-il (em que a fração está ligada à estrutura parental através de um átomo de carbono aromático) é considerado um grupo aril, enquanto o 1,2,3,4-tetra-hidronaftaleno 1-il (em que a fração está ligada à estrutura parental através de um átomo de carbono não aromático) não é considerado um grupo aril. Da mesma forma, um grupo 1,2,3,4-tetrahidroquinolin-8-il (em que a fração está ligada à estrutura parental através de um átomo de carbono aromático) é considerado um grupo aril, enquanto o grupo 1,2,3,4-tetrahidroquinolin-1-il (em que a fração está ligada à estrutura parental por meio de um átomo de nitrogênio não aromático) não é considerado um grupo aril. No entanto, o termo "aril" não abrange ou se sobrepõe a "heteroaril", conforme definido aqui, independentemente do ponto de ligação (*por exemplo*, ambos quinolin-5-il e quinolin-2-il são grupos heteroaril).

[068] "Heteroaril" indica um anel aromático que contém o número indicado de átomos no anel (*por exemplo*, 5 a 12 ou 5 a 10 membros heteroaril) composto de um ou mais heteroátomos (*por exemplo*, 1, 2, 3 ou 4 heteroátomos) selecionados de N, O

e S e com os átomos restantes do anel sendo carbono. O heteroaril de 5 membros é um heteroaril com 5 átomos no anel. O heteroaril de 6 membros é um heteroaril com 6 átomos no anel. Grupos heteroaril não contêm átomos S e O adjacentes. Em algumas modalidades, o número total de átomos de S e O no grupo heteroaril não é superior a 2. Em algumas modalidades, o número total de átomos de S e O no grupo heteroaril não é superior a 1. Salvo indicação em contrário, os grupos heteroaril podem ser ligados à estrutura parental por um átomo de carbono ou nitrogênio, conforme a valência permitir. Por exemplo, "piridil" inclui grupos 2-piridil, 3-piridil e 4-piridil, e "pirrolil" inclui grupos 1-pirrolil, 2-pirrolil e 3-pirrolil. Quando o nitrogênio está presente em um anel heteroaril, ele pode, onde a natureza dos átomos e grupos adjacentes o permitir, existir em um estado oxidado (*isto é*, N^+-O^-). Além disso, quando o enxofre está presente em um anel heteroaril, ele pode, onde a natureza dos átomos e grupos adjacentes permitir, existir em um estado oxidado (*isto é*, S^+-O^- ou SO_2). Os grupos heteroaril podem ser monocíclicos ou policíclicos (*por exemplo*, bicíclicos, tricíclicos).

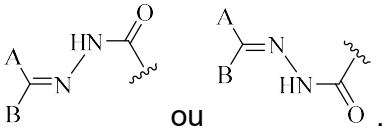
[069] Em alguns casos, um grupo heteroaril é monocíclico. Exemplos incluem pirrol, pirazol, imidazol, triazol (*por exemplo*, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,3,4-triazol), tetrazol, furano, isoxazol, oxazol, oxadiazol (*por exemplo*, 1,2,3-oxadiazol, 1,2,4-oxadiazol, 1,3,4-oxadiazol), tiofeno, isotiazol, tiazol, tiadiazol (*por exemplo*, 1,2,3-tiadiazol, 1,2,4-tiadiazol, 1,3,4-tiadiazol), piridina, piridazina, pirimidina, pirazina, triazina (*por exemplo*, 1,2,4-triazina, 1,3,5-triazina) e tetrazina.

[070] O termo "acil" é reconhecido na técnica e refere-se a um grupo representado pela fórmula geral hidrocarbil-C(O)-, por exemplo, alquil-C(O)-.

[071] O termo "alquil" refere-se ao radical de grupos alifáticos saturados, incluindo grupos alquil de cadeia linear e grupos alquil de cadeia ramificada. Em algumas modalidades, um alquil de cadeia linear ou cadeia ramificada possui 30 ou menos átomos de carbono em sua espinha dorsal (*por exemplo*, C_1-C_{30} para cadeias lineares, C_4-C_{30} para cadeias ramificadas) e em outras modalidades, 20 ou menos.

Em certas modalidades, grupos alquil são grupos alquil inferiores, *por exemplo* , metil, etil, *n*-propil, *i*-propil, *n*-butil e *n*-pentil. Além disso, o termo "alquil", usado em todo o relatório descritivo, exemplos e reivindicações, pretende incluir ambos "alquis não substituídos" e "alquis substituídos", o último dos quais refere-se a frações alquil com substituintes que substituem um hidrogênio em um ou mais carbonos da espinha dorsal de hidrocarbonetos. Em certas modalidades, um alquil de cadeia linear ou cadeia ramificada possui 30 ou menos átomos de carbono em sua espinha dorsal (*por exemplo*, C_1-C_{30} para cadeias lineares, C_3-C_{30} para cadeias ramificadas). Em algumas modalidades, a cadeia possui dez ou menos átomos de carbono (C_1-C_{10}) em sua espinha dorsal. Em outras modalidades, a cadeia possui seis ou menos átomos de carbono (C_1-C_6) em sua espinha dorsal.

[072] Os termos "fração hidrazona" ou "hidrazona" se referem a hidrazonas E e/ou Z, por exemplo,



.

A estereoquímica da fração hidrazona pode ser *E* or *Z*.O termo hidrazona como aqui utilizado inclui os isômeros *E* e *Z* . As frações de hidrazona aqui divulgadas são geralmente desenhadas em uma configuração, mas entende-se que esta divulgação pode incluir ambos *E* e/ou *Z*.

[073] Em vários locais do presente relatório descritivo, os substituintes dos compostos da divulgação são divulgados em grupos ou em faixas. Pretende-se especificamente que a divulgação inclua todos os subconjuntos individuais dos membros desses grupos e faixas. Por exemplo, o termo “C_1-C_6 alquil” destina-se especificamente a divulgar individualmente metil, etil, propil, isopropil, *n*-butil, *sec*-butil, isobutil, etc.

[074] Um "sal farmaceuticamente aceitável" é um sal de um composto que é adequado para uso farmacêutico, incluindo, entre outros, sais metálicos (por exemplo,

sódio, potássio, magnésio, cálcio, etc.), sais de adição de ácido (por exemplo, ácidos minerais, ácidos carboxílicos, etc.) e sais de adição de bases (por exemplo, amônia, aminas orgânicas, etc.). A forma de sal de adição de ácido de um composto que ocorre em sua forma livre como base pode ser obtida tratando a referida forma de base livre com um ácido apropriado, como um ácido inorgânico, por exemplo, um hidro-hálico, como clorídrico ou bromídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico e semelhantes; ou um ácido orgânico, como, por exemplo, acético, hidroxiacético, propanoico, lático, pirúvico, malônico, succínico, maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanossulfônico, etanossulfônico, benzenossulfônico, *p*-toluenossulfônico, cíclico, salicílico, *p*-aminosalicílico, pamoico e semelhantes (ver, por exemplo, WO 01/062726. Alguns sais farmaceuticamente aceitáveis listados por Berge *et al.,* J. Pharm. Sci., 66: 1-19 (1977), incorporated herein by reference in its entirety). Os compostos contendo prótons acídicos podem ser convertidos na sua forma de sal de adição de base não tóxica terapeuticamente ativa, por exemplo, sais de metal ou amina, por tratamento com bases orgânicas e inorgânicas apropriadas. As formas de sal de base apropriadas incluem, por exemplo, sais de amônio, sais ou íons de metais alcalinos e alcalino-terrosos, por exemplo, lítio, sódio, potássio, magnésio, sais de cálcio e semelhantes, sais com bases orgânicas, por exemplo *N*-metil-D-glucamina, sais de hidrabamina, e sais com aminoácidos tais como, por exemplo, arginina, lisina e semelhantes. Inversamente, as referidas formas de sal podem ser convertidas nas formas livres por tratamento com uma base ou ácido apropriado. Os compostos e seus sais podem estar na forma de um solvato, o qual está incluído no escopo da presente divulgação. Tais solvatos incluem, por exemplo, hidratos, alco-olatos e semelhantes (ver, por exemplo, WO 01/062726).

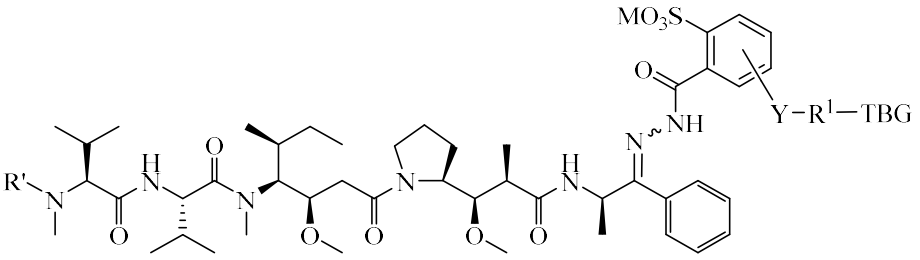
[075] A divulgação fornece ainda composições farmacêuticas compreendendo um ou mais compostos da divulgação juntamente com um transportador ou excipiente farmaceuticamente aceitável. Os compostos ou

composições farmacêuticas da divulgação podem ser utilizados *in vitro* ou *in vivo*.

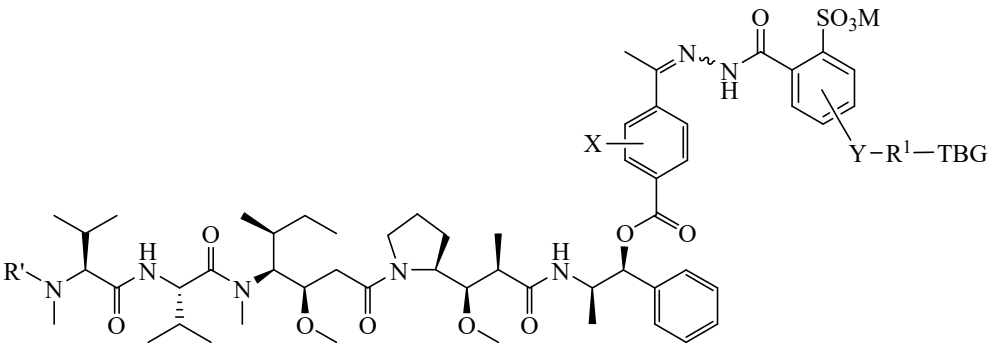
[076] O termo "isômero", como utilizado neste documento, inclui, mas não está limitado a, tautômeros, *cis*- e *trans*-isômeros (*E* (entgegen), *Z* (zusammen)), *R*- e *S*-enantiômeros (a referida notação R e S é utilizada em correspondência com as regras descritas em Pure Appl. Chem. (1976), 45, 11-30), diastereômeros, (D)-isômeros, (L)-isômeros, estereoisômeros, misturas racêmicas dos mesmos e outras misturas dos mesmos. Todos estes isômeros, bem como as suas misturas, devem ser incluídos nesta divulgação. Os tautômeros, embora não indicados explicitamente nas fórmulas aqui descritas, devem ser incluídos no escopo da presente divulgação.

Compostos da Divulgação

[077] Modalidades da presente divulgação fornecem um composto com a estrutura representada pela Fórmula I ou Fórmula II:



Fórmula I **mula I**



Fórmula II **mula II**

ou um sal, hidrato, solvato ou isômero farmaceuticamente aceitável do mesmo; em que:

R’ é H ou $–CH_3$,

M é selecionado de H e um contra-íon farmaceuticamente aceitável, como, Na^+, K^+, NR_4^+, ou NHR_3^+, em que R é selecionado de H e C_1-C_4 alquil,

Y está ausente ou selecionado de um C_1-C_6 alquil, -NH-C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -C(O)-O-, e –O-C(O)-,

R^1 está ausente ou um C_1-C_{18} alquil opcionalmente substituído em que opcionalmente até seis átomos de carbono no referido C_1-C_{18} alquil são substituídos independentemente por $-OCH_2CH_2-$,

X é H ou selecionado de halogênio (por exemplo, -F, -Cl, -Br ou-I), $-NO_2$, $-NR^2R^3$, $-OR^2$, $-NHCOR^2$ e $-OCOR^2$, em que R^2 e R^3 são cada um deles selecionados independentemente de H e C_1-C_4 alquil, e

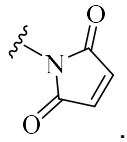
TBG é um grupo de ligação ao tiol selecionado de um grupo maleimida opcionalmente substituído, um grupo haloacetamida opcionalmente substituído, um grupo haloacetato opcionalmente substituído, um grupo piridiltio opcionalmente substituído, um grupo isotiocianato opcionalmente substituído, um grupo vinilcarbonil opcionalmente substituído, um grupo vinilcarbonil opcionalmente substituído, um grupo aziridina opcionalmente substituído, um grupo dissulfeto opcionalmente substituído e um grupo acetileno opcionalmente substituído.

[078] Em algumas modalidades, o composto da estrutura da Fórmula I ou II é formulado como uma composição farmacêutica contendo opcionalmente um transportador farmaceuticamente aceitável, é administrado a um organismo e covalentemente se liga seletiva e rapidamente *in situ* ao grupo tiol da cisteína-34 de albumina endógena na circulação sanguínea.

[079] Em algumas modalidades, R’ é $–CH_3$. Em outras modalidades, R' é H.

[080] Em algumas modalidades, o grupo de ligação ao tiol, TBG, é o grupo

maleimida:

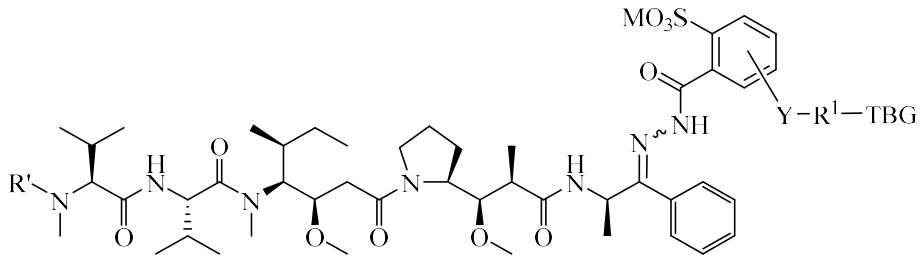


.

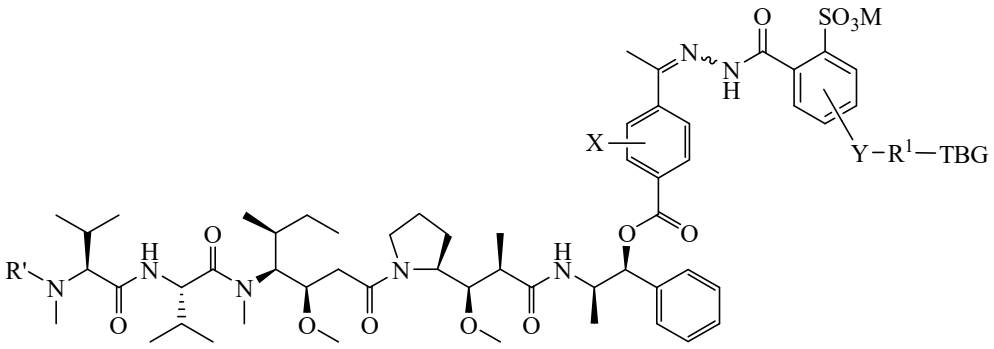
[081] Em algumas modalidades, a droga à base de peptídeo altamente citotóxico é a auristatina E derivatizada de tal forma que contém um grupo carbonil que permite a formação de uma ligação hidrazona sensível ao ácido com um ligante de solubilização da água de maleimida contendo uma fração de hidrazida.

[082] Em algumas modalidades, a divulgação fornece uma composição farmacêutica compreendendo um composto como aqui divulgado e, opcionalmente, um transportador farmaceuticamente aceitável, em que a composição farmacêutica é administrada por via intravenosa e covalentemente se liga seletiva e rapidamente *in situ* ao grupo tiol da cisteína-34 da albumina endógena na circulação sanguínea.

[083] Em algumas modalidades, nos compostos de ligação à albumina aqui divulgados, a droga altamente citotóxica é um derivado de pentapeptídeo contendo carbonil da auristatina E, a fração de ligação à albumina é um grupo de ligação ao tiol (TBG), por exemplo, um grupo maleimida, que liga-se rápida e seletivamente à cisteína-34 da albumina após a administração e a ligação sensível ao ácido é uma ligação derivada de benzoil-hidrazona da fórmula geral I e II:



Fórmula I nula I



Fórmula II **nula II**

ou um sal, hidrato, solvato ou isômero farmaceuticamente aceitável do mesmo; em que:

R' é H ou $–CH_3$,

M é selecionado de H e um contra-íon farmaceuticamente aceitável, como, Na^+, K^+, NR_4^+, or NHR_3, em que R é selecionado de H e C_1-C_4 alquil,

Y está ausente ou selecionado de um C_1-C_6 alquil, -NH-C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -C(O)-O-, e –O-C(O)-,

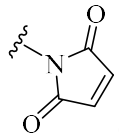
R^1 está ausente ou um C_1-C_{18} alquil opcionalmente substituído em que opcionalmente até seis átomos de carbono no referido C_1-C_{18} alquil são substituídos independentemente por $-OCH_2CH_2-$,

X é H ou selecionado de halogênio (por exemplo, -F, -Cl, -Br ou-I), $-NO_2$, $-NR^2R^3$, $-OR^2$, $-NHCOR^2$ e $-OCOR^2$, em que R^2 e R^3 são cada um deles selecionados independentemente de H e C_1-C_4 alquil, e

TBG é um grupo de ligação ao tiol selecionado de um grupo maleimida opcionalmente substituído, um grupo haloacetamida opcionalmente substituído, um grupo haloacetato opcionalmente substituído, um grupo piridiltio opcionalmente substituído, um grupo isotiocianato opcionalmente substituído, um grupo vinilcarbonil opcionalmente substituído, um grupo vinilcarbonil opcionalmente substituído, um grupo aziridina opcionalmente substituído, um grupo dissulfeto opcionalmente substituído e um grupo acetileno opcionalmente substituído.

[084] Em algumas modalidades, o TBG é substituído por C_1-C_6 alquil ou halogênio. Em algumas modalidades, o TBG é substituído por metil, -Cl ou -Br.

[085] Um grupo dissulfeto pode ser ativado por um ácido tionitrobenzoico (por exemplo, ácido 5'-tio-2-nitrobenzoico) como o grupo trocável. Um grupo maleimida ou piridilditio pode, quando apropriado, ser substituído por um grupo alquil ou pelos grupos solúveis em água acima. Em geral, um grupo de ligação a tiol possui propriedades de ligação a proteínas, isto é, liga-se covalentemente ("um grupo de ligação a proteínas covalentes") em um ambiente fisiológico, a aminoácidos específicos na superfície da proteína. Em algumas modalidades, o grupo maleimida, o grupo haloacetamida, o grupo haloacetato, o grupo piridilditio, o grupo dissulfeto, o grupo vinilcarbonil, o grupo aziridina e/ou o grupo acetileno reagem com grupos tiol (-SH) de cisteínas. Em algumas modalidades, o grupo de ligação a proteínas é um grupo maleimida



que se liga à cisteína-34 da albumina.

[086] Em algumas modalidades, o sistema de distribuição de drogas contém uma fração de hidrazona clivável, sensível ao ácido. A clivagem da porção hidrazona e a meia-vida da liberação da droga variam de acordo com a estrutura do derivado carbonil.

[087] Em algumas modalidades, a meia-vida da liberação da droga ligada à albumina na faixa de pH de 4,0-6,5 varia de cerca de 1,5 horas a cerca de 80 horas.

[088] Sem estar limitado pela teoria, um anel fenil compreendendo um grupo de retirada de elétrons, como um ácido sulfônico (-SO_3H) ou grupo sulfonato (-SO_3^-) ligado à posição *orto* à ligação hidrazona, estabiliza a fração hidrazona, resultando em uma liberação lenta e prolongada do medicamento em condições acídicas.

[089] Em algumas modalidades, R' é –CH_3. Em outras modalidades, R' é H.

[090] Em algumas modalidades, Y e/ou R^1 estão presentes. Em algumas

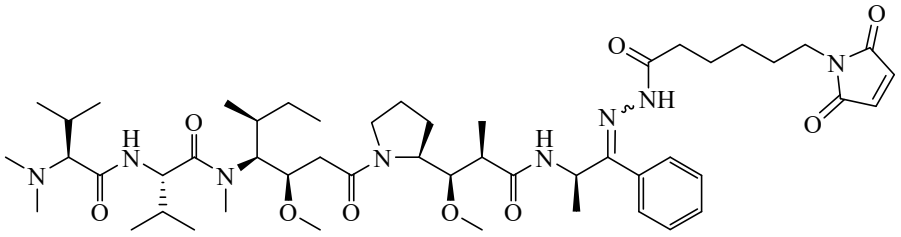
modalidades, Y está ausente. Em algumas modalidades, R^1 está ausente. Em algumas modalidades, Y e R^1 estão ausentes.

[091] Em algumas modalidades, Y é selecionado de metil, etil, -NH-C(O)-, -C(O)-NH-,

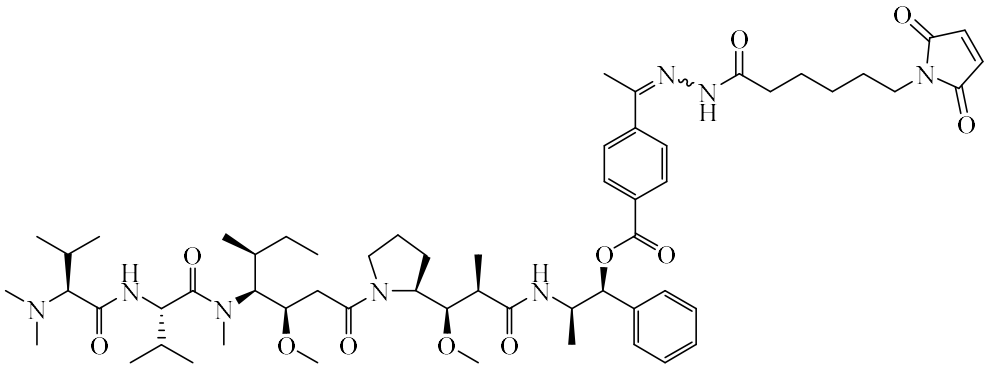
-C(O)-O-, e –O-C(O)-.

[092] Em algumas modalidades, R^1 é C_1-C_{18} alquil opcionalmente substituído. Em algumas modalidades, R^1 é C_1-C_{18} alquil substituído em que um átomo de carbono no referido C_1-C_{18} alquil é substituído por -OCH_2CH_2-. Em algumas modalidades, R_1 é C_1-C_{18} alquil opcionalmente substituído em que dois átomos de carbono no referido C_1-C_{18} alquil são substituídos por -OCH_2CH_2-. Em algumas modalidades, R^1 é C_1-C_{18} alquil opcionalmente substituído em que três átomos de carbono no referido C_1-C_{18} alquil são substituídos por -OCH_2CH_2-. Em algumas modalidades, R^1 é C_1-C_{18} alquil opcionalmente substituído em que quatro átomos de carbono no referido C_1-C_{18} alquil são substituídos por -OCH_2CH_2-. Em algumas modalidades, R^1 é C_1-C_{18} alquil opcionalmente substituído em que cinco átomos de carbono no referido C_1-C_{18} alquil são substituídos por -OCH_2CH_2-. Em algumas modalidades, R^1 é C_1-C_{18} alquil opcionalmente substituído em que seis átomos de carbono no referido C_1-C_{18} alquil são substituídos por -OCH_2CH_2-.

[093] US6884869-B2 (Pedido Nº 10/001.191, depositado em 01.11.2001) descreve conjugados de anticorpo-droga nos quais os derivados pentapeptídeos das estruturas químicas da Fórmula A e Fórmula B ilustrados abaixo:



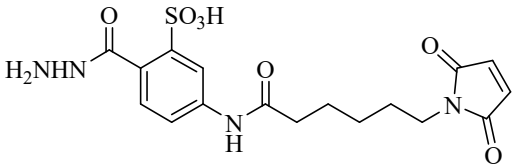
Fórmula A



Fórmula B

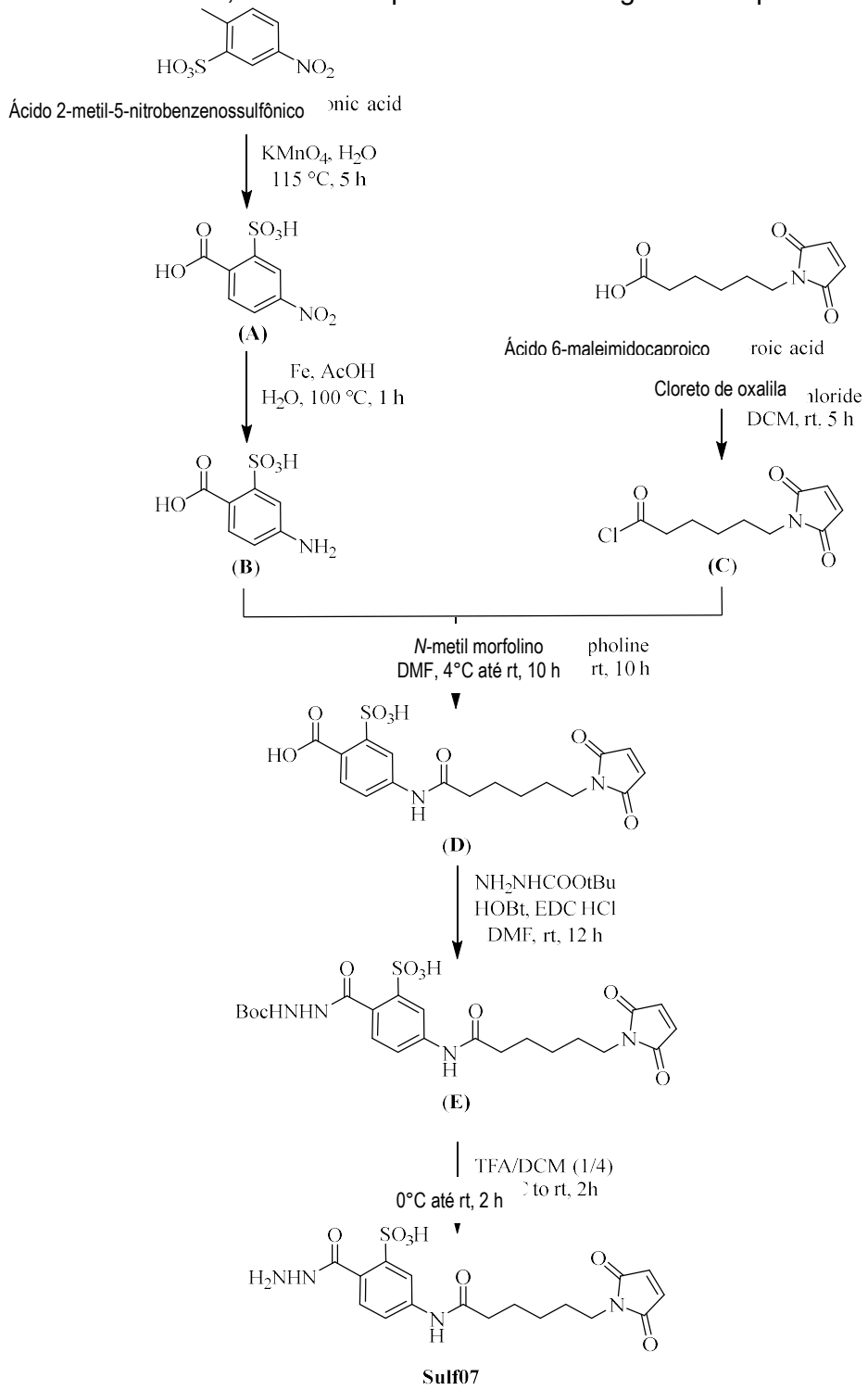
[094] Estes foram conjugados com anticorpos contendo tiol. Ambos os compostos contêm uma fração alifática de 6-maleimidocaproil-hidrazona que proporciona solubilidade aquosa mínima aos dois compostos de Fórmula A e Fórmula B representados acima. De fato, a conjugação de ambos os compostos anteriores aos anticorpos foi alcançada pela dissolução dos compostos apenas com a ajuda de solventes orgânicos, isto é, uma mistura 9:1 de acetonitrila:DMSO. O uso de solventes exclusivamente orgânicos na formulação de uma composição farmacêutica aplicável para acoplamento *in situ* à cisteína-34 de albumina circulando na corrente sanguínea, nomeadamente a abordagem de distribuição de drogas aqui descrita, não é possível. Por conseguinte, em algumas modalidades, as presentes composições não incluem um solvente orgânico.

[095] Deste modo, ligantes de maleimida aromática compreendendo uma fração de ácido sulfônico foram inventados prodzindo solubilidade aquosa suficiente às pró-drogas de ligação à albumina para a formulação de uma composição farmacêutica para administração intravenosa. Um desses ligantes é ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazinocarbonil)-benzenossulfônico , abreviado Sulf07, com a estrutura química descrita abaixo:

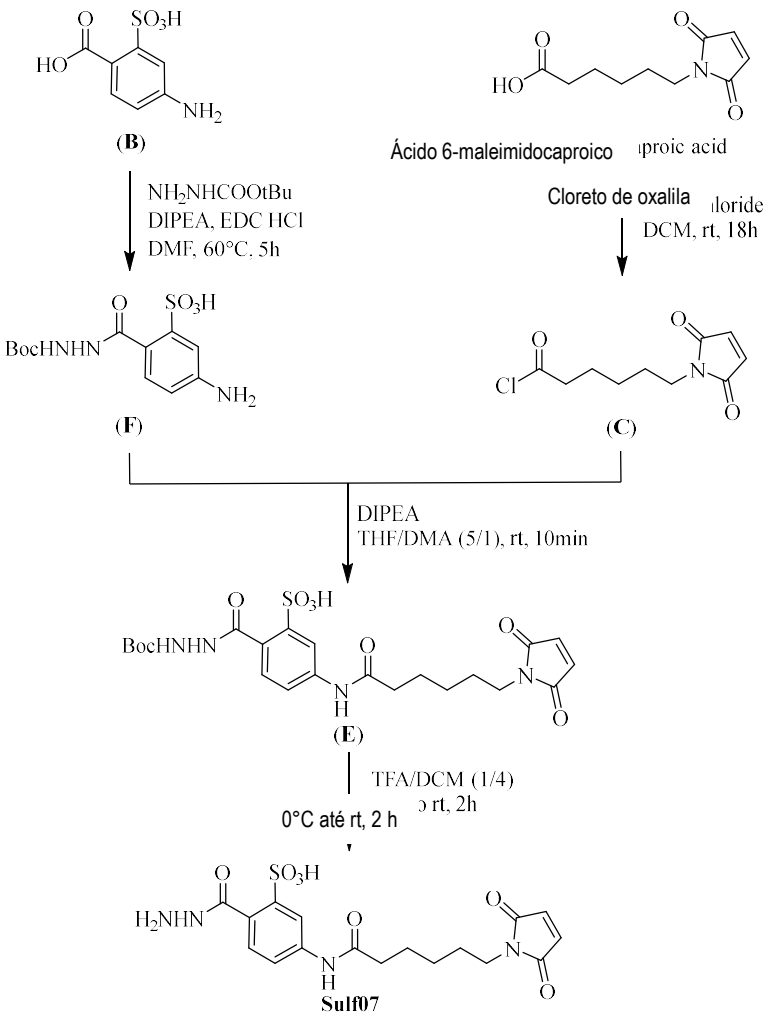


Estrutura química de Sulf07

[096] O ligante Sulf07, ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazinocarbonil)-benzenossulfônico, foi preparado de acordo com a rota A e/ou rota B, conforme representado nos seguintes esquemas sintéticos:



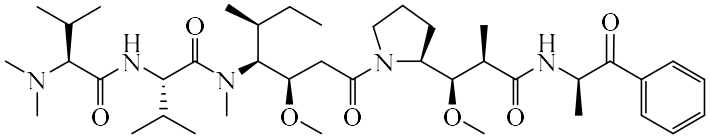
Esquema 1, Rota A



Esquema 2, Rota B

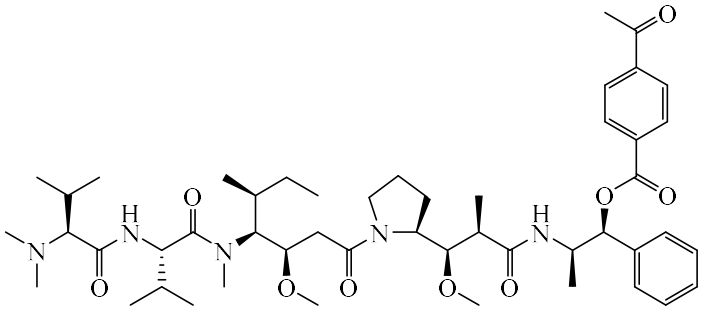
[097] O novo procedimento sintético e a caracterização do novo ligante Sulf07, ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazinocarbonil)benzenossulfônico, foi alcançado de acordo com a rota A e B é descrito no Exemplo 1.

[098] O ligante Sulf07 reagiu com:

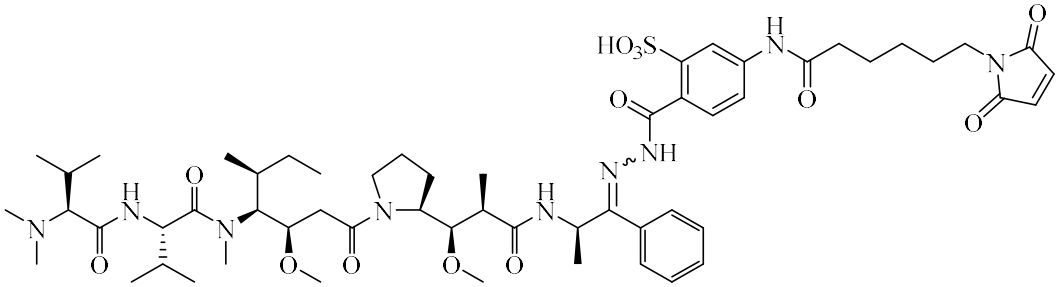


AE-Ceto

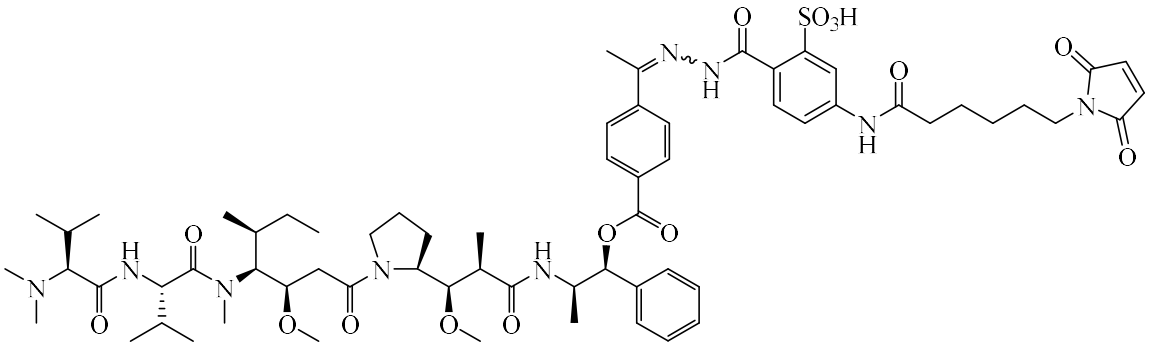
ou



AE-Éster para obter os compostos de Fórmula III (abreviado AE-Ceto-Sulf07) e Fórmula IV (abreviado AE-Éster-Sulf07), respectivamente:



Fórmula III (AE-Ceto-Sulf07)

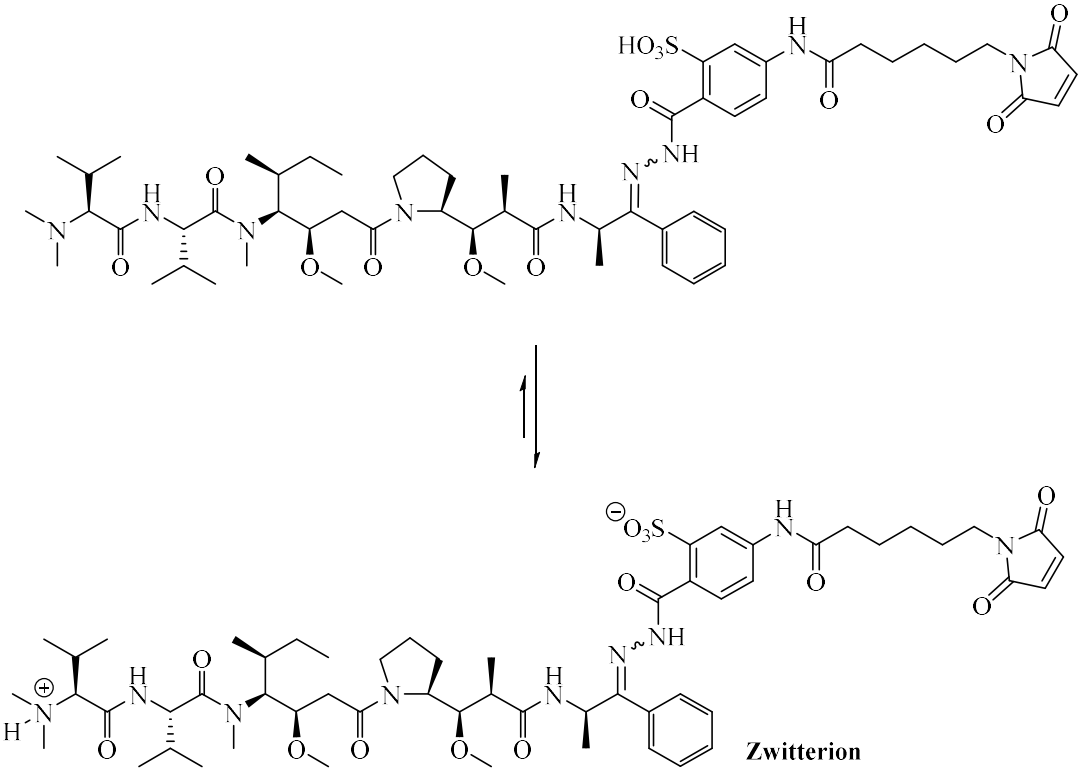


Fórmula IV (AE-Éster-Sulf07)

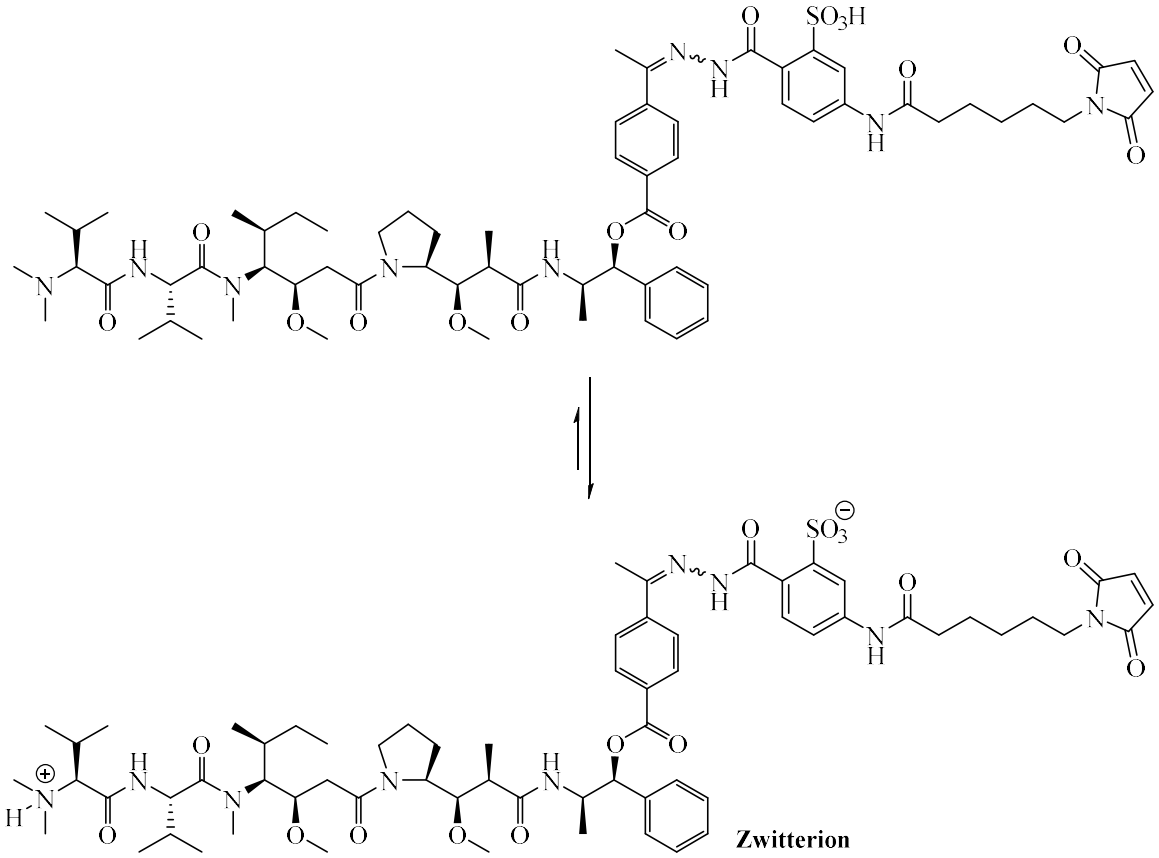
[099] A síntese e caracterização de AE-Ceto-Sulf07 (Fórmula III) e AE-Éster-

Sulf07 (Fórmula IV) é descrita nos Exemplos 2 e 3.

[0100] As análises das estruturas de AE-Ceto-Sulf07 e AE-Éster-Sulf07 revelam que em ambas as moléculas duas frações (grupos $–SO_3H$ e $–N(CH_3)_2$) existem como um par ácido-base, formando zwitterions representado no Esquema 3 e no Esquema 4.

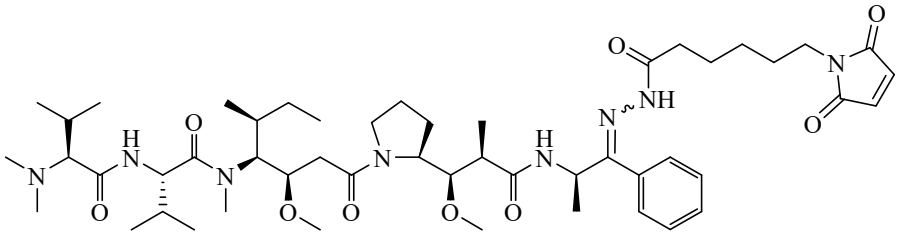


Esquema 3

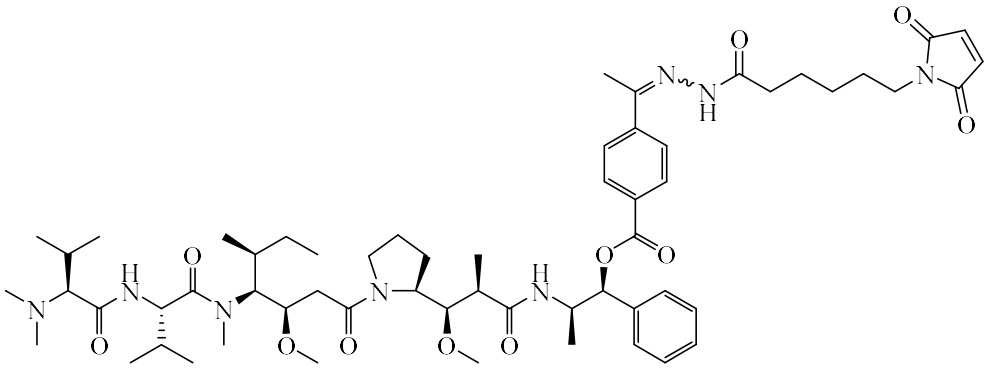


Esquema 4

[0101] A fração de ácido sulfônico integrada no ligante Sulf07, bem como a propriedade zwitteriônica de duas pró-drogas de auristatina AE-Ceto-Sulf07 e AE-Éster-Sulf07, fornecem solubilidade aquosa suficiente para formular uma composição farmacêutica e, mais importante, uma alta estabilidade da fração maleimida que é significativamente melhorada em relação à Fórmula A (AE-Ceto-EMCH) e B (AE-Éster-EMCH):



Fórmula A



Fórmula B

divulgado em US6884869-B2 (Appl. No.: 10/001.191, depositado, 01.11.2001).

[0102] Para a ligação *in situ* à cisteína-34 da albumina endógena, a estabilidade do grupo maleimida em condições fisiológicas na faixa de pH de 7,4-7,6 é um critério para administração intravenosa e ligação eficiente à albumina circulante na corrente sanguínea.

[0103] Como mostrado na Figura 1 e Figura 2, a estabilidade da fração maleimida contra a hidrólise para ambos os AE-Ceto-Sulf07 e AE-Éster-Sulf07 é consideravelmente melhorada em comparação com os dois compostos descritos em US6884869-B2, isto é, AE-Ceto-EMCH (composto de Fórmula A) e AE-Éster-EMCH (composto de Fórmula B). Após 4 horas de incubação à temperatura ambiente no tampão de reconstituição (fosfato de sódio 50 mM, pH 7,65, contendo 4% de HPβCD e sacarose 5%), 2,2% de maleimida de AE-Ceto-Sulf07 foram hidrolisadas em comparação com 5,4% de hidrólise de maleimida para AE-Ceto-EMCH, e similarmente 2,5% de maleimida de AE-Éster-Sulf07 foram hidrolisados em comparação com 11,0% para AE-Éster-EMCH. Além disso, as formulações de ingrediente farmacêutico ativo (API) dos derivados Sulf07 mostraram excelente estabilidade (Figura 24 e Figura 25) sob condições de degradação acelerada (por exemplo, a 55 ^{o}C por até 264 horas), enquanto as frações de maleimida dos derivados EMCH foram rapidamente hidrolisados. A hidrólise mínima de maleimida é essencial

para o desenvolvimento e a fabricação do produto, para garantir a ligação quantitativa endógena à albumina e, assim, limitar qualquer liberação prematura de droga livre em circulação e maximizar a eficiência clínica.

[0104] Uma outra vantagem das soluções aquosas de AE-Ceto-Sulf07 e AE-Éster-Sulf07 é que eles possuem um valor fisiológico de pH na faixa de 6,8 a 7,5.

[0105] Além disso, a solubilidade e estabilidade das APIs de zwitterion aumentam quando usadas em combinação com transportadores aprovados farmacêuticamente, como Tween 80, 2-Hidroxipropil-βciclodextrina, e isso pode facilitar a formulação de uma composição farmacêutica.

[0106] As formulações farmacêuticas de AE-Ceto-Sulf07 e AE-Éster-Sulf07 alcançaram uma ligação muito rápida à albumina no plasma (humano, murino e de rato (Figuras 5-10)). A especificidade da ligação à albumina para ambos os agentes terapêuticos também foi demonstrada no plasma humano (Figuras 3-4).

Composições Farmacêuticas

[0107] Em algumas modalidades, a divulgação fornece uma composição farmacêutica compreendendo um composto aqui descrito.

[0108] A quantidade total de um composto em uma composição a ser administrada a um paciente é aquela que é adequada para esse paciente. Um versado na técnica apreciaria que indivíduos diferentes podem exigir quantidades totais diferentes da substância terapeuticamente eficaz. Em algumas modalidades, a quantidade do composto é uma quantidade farmaceuticamente eficaz. O trabalhador versado seria capaz de determinar a quantidade do composto em uma composição necessária para tratar um paciente com base em fatores como, por exemplo, idade, peso e condição física do paciente. A concentração do composto depende da sua solubilidade na solução de administração intravenosa e do volume de fluido que pode ser administrado. Por exemplo, a concentração do composto pode ser de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 50 mg/mL na composição injetável. Em algumas modalidades, a

concentração do composto pode estar na faixa de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 40 mg/mL.

[0109] As composições e kits farmacêuticos da presente divulgação também podem conter diluentes, enchimentos, sais, tampões, estabilizadores, solubilizadores, protetores e outros materiais bem conhecidos na técnica. O termo "farmaceuticamente aceitável" significa um material não tóxico que não interfere com a eficácia da atividade biológica do(s) ingrediente(s) ativo(s). As características do transportador dependerão da via de administração.

[0110] As composições podem ser administradas de várias maneiras convencionais. Vias de administração exemplificativas que podem ser usadas incluem oral, parenteral, intravenosa, intra-arterial, cutânea, subcutânea, intramuscular, tópica, intracraniana, intraorbital, oftálmica, intravítrea, intraventricular, intracapsular, intraspinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerossol, administração do sistema nervoso central (CNS) ou administração por supositório. Em algumas modalidades, as composições são adequadas para administração parenteral. Estas composições podem ser administradas, por exemplo, intraperitonealmente, intravenosamente ou intratecalmente. Em algumas modalidades, as composições são injetadas por via intravenosa. Em algumas modalidades, uma formulação reconstituída pode ser preparada reconstituindo uma composição de composto liofilizado em um líquido de reconstituição compreendendo, por exemplo, um álcool, DMSO e/ou polietileno glicol e água e/ou um tampão de sal. Essa reconstituição pode compreender adicionar o líquido de reconstituição e misturar, por exemplo, agitando a mistura ou por vórtice da mistura. A formulação reconstituída pode então ser tornada adequada para injeção misturando, por exemplo, solução de Ringer com lactato, 5% de solução de glicose, solução salina isotônica ou um tampão de sal adequado com a formulação para criar uma composição injetável. Um versado na técnica apreciaria que um método para administrar uma formulação ou composição de substância

terapeuticamente eficaz dependeria de fatores como idade, peso e condição física do paciente sendo tratado e a doença ou condição sendo tratada. O trabalhador versado seria, portanto, capaz de selecionar um método de administração ideal para um paciente, caso a caso.

[0111] Em algumas modalidades, os compostos e composições aqui divulgados são para uso no tratamento de um câncer, uma doença viral, doença autoimune, doença inflamatória aguda ou crônica e uma doença causada por bactérias, fungos ou outros micro-organismos.

[0112] Em algumas modalidades, o composto divulgado neste documento pode ser utilizado na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença selecionada de um câncer, uma doença viral, uma doença autoimune, uma doença inflamatória aguda ou crônica e uma doença causada por bactérias, fungos ou outros micro-organismos.

[0113] Em algumas modalidades, o câncer é um câncer de sangue ou um câncer de tumor sólido. Em algumas modalidades, a doença é câncer e é selecionada de carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiplo e melanoma.

[0114] Em algumas modalidades, o câncer é adenocarcinoma, melanoma uveal, leucemia aguda, neuroma acústico, carcinoma ampular, carcinoma anal, astrocitoma, basalioma, câncer pancreático, tumor do tecido conjuntivo, câncer de bexiga, carcinoma brônquico, carcinoma brônquico de células não pequenas, câncer de mama, linfoma de Burkitt, carcinoma de corpo, síndrome da CUP, câncer de cólon, câncer de intestino delgado, câncer de ovário, carcinoma endometrial, câncer de vesícula biliar, carcinomas de vesícula biliar, câncer uterino, câncer cervical, pescoço, nariz e tumores da orelha, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, câncer uretral, câncer de pele, gliomas, câncer testicular, sarcoma de Kaposi, câncer de laringe, câncer ósseo, carcinoma colorretal, tumores de cabeça/pescoço, carcinoma do cólon, craniofaringgeoma, câncer de fígado, leucemia, câncer de

pulmão, câncer de pulmão de células não pequenas, linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, câncer de estômago, câncer de cólon, meduloblastoma, melanoma, meningioma, câncer de rim, carcinomas de células renais, oligodendroglioma, carcinoma de esôfago, carcinomas osteolíticos e carcinomas osteoplásticos, osteossarcoma, carcinoma de ovário, carcinoma de pâncreas, câncer de pênis, câncer de próstata, câncer de língua, carcinoma de ovário ou câncer de glândula linfática.

[0115] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um kit que compreende um composto como aqui descrito e um excipiente farmaceuticamente aceitável, um transportador e/ou um diluente.

[0116] Em algumas modalidades, um ou mais excipientes podem ser incluídos na composição. Um versado na técnica apreciaria que a escolha de qualquer excipiente pode influenciar a escolha de qualquer outro excipiente. Por exemplo, a escolha de um excipiente pode impedir o uso de um ou mais excipientes adicionais porque a combinação de excipientes produziria efeitos indesejáveis. Um versado na técnica seria capaz de determinar empiricamente quais excipientes, se houver, incluir nas composições. Os excipientes podem incluir, mas não estão limitados a, cossolventes, agentes solubilizantes, tampões, agentes de ajuste de pH, agentes de volume, tensoativos, agentes de encapsulamento, agentes de ajuste de tonicidade, agentes de estabilização, protetores e modificadores de viscosidade. Em algumas modalidades, pode ser benéfico incluir um transportador farmaceuticamente aceitável nas composições.

[0117] Em algumas modalidades, um agente solubilizante pode ser incluído composições. Os agentes solubilizantes podem ser úteis para aumentar a solubilidade de qualquer um dos componentes da composição, incluindo um composto ou um excipiente. Os agentes solubilizantes aqui descritos não pretendem constituir uma lista exaustiva, mas são fornecidos apenas como agentes solubilizantes exemplificativos que podem ser utilizados nas composições. Em certas modalidades, os agentes

solubilizantes incluem, mas não estão limitados a, álcool etílico, álcool *terc*-butílico, polietileno glicol, glicerol, metilparabeno, propilparabeno, polietileno glicol, polivinil pirrolidona, ciclodextrinas, como dimetil-β-ciclodextrina, hidroxietil-β- ciclodextrina, hidroxipropil-β-ciclodextrina e trimetil-β-ciclodextrina e combinações dos mesmos, e quaisquer sais farmaceuticamente aceitáveis e/ou combinações dos mesmos.

[0118] O pH das composições pode ser qualquer pH que forneça propriedades desejáveis para a formulação ou composição. As propriedades desejáveis podem incluir, por exemplo, estabilidade do composto, retenção aumentada de composto em comparação com composições com outros valores de pH e eficiência de filtração aprimorada. Em algumas modalidades, o valor de pH das composições pode ser de cerca de 3,0 a cerca de 9,0, por exemplo, de cerca de 5,0 a cerca de 7,0. Em modalidades particulares, o valor de pH das composições pode ser 5,5 ± 0,1, 5,6 ± 0,1, 5,7 ± 0,1, 5,8 ± 0,1, 5,9 ± 0,1, 6,0 ± 0,1, 6,1 ± 0,1, 6,2 ± 0,1, 6,3 ± 0,1, 6,4 ± 0,1,6,5 ± 0,1, 6,6 ± 0,1, 6,7 ± 0,1, 6,8 ± 0,1, 6,9 ± 0,1, 7,0 ± 0,1, 7,1 ± 0,1 e 7,2 ± 0,1.

[0119] Em algumas modalidades, pode ser benéfico tamponar o pH incluindo um ou mais tampões nas composições. Em certas modalidades, um tampão pode ter um pKa de, por exemplo, cerca de 5,5, cerca de 6,0 ou cerca de 6,5. Um versado na técnica apreciaria que um tampão apropriado pode ser escolhido para inclusão em composições com base em seu pKa e outras propriedades. Os tampões são bem conhecidos na técnica. Por conseguinte, os tampões descritos neste documento não se destinam a constituir uma lista exaustiva, mas são fornecidos apenas como tampões exemplificativos que podem ser utilizados nas formulações ou composições da presente divulgação. Em certas modalidades, um tampão inclui, mas não está limitado a Tris, Tris-HCl, fosfato de potássio, fosfato de sódio, citrato de sódio, ascorbato de sódio, combinações de fosfato de sódio e potássio, Tris/Tris-HCl, bicarbonato de sódio, fosfato de arginina, cloridrato de arginina, cloridrato de histidina,

cacodilato, succinato, ácido 2-(*N*-morfolino)etanossulfônico (MES), maleato, bis-tris, fosfato, carbonato e quaisquer sais farmaceuticamente aceitáveis e/ou combinações dos mesmos.

[0120] Em algumas modalidades, um agente de ajuste de pH pode ser incluído nas composições. A modificação do pH de uma composição pode ter efeitos benéficos, por exemplo, na estabilidade ou solubilidade de um composto, ou pode ser útil para tornar uma composição adequada para administração parenteral. Os agentes de ajuste de pH são bem conhecidos na técnica. Por conseguinte, os agentes de ajuste de pH aqui descritos não pretendem constituir uma lista exaustiva, mas são fornecidos apenas como agentes de ajuste de pH exemplificativos que podem ser utilizados nas composições. Os agentes de ajuste de pH podem incluir, por exemplo, ácidos e bases. Em algumas modalidades, um agente de ajuste de pH inclui, mas não está limitado a, ácido acético, ácido clorídrico, ácido fosfórico, hidróxido de sódio, carbonato de sódio e combinações dos mesmos.

[0121] Em algumas modalidades, um agente de volume pode ser incluído nas composições. Os agentes de volume são comumente usados em composições liofilizadas para fornecer volume adicionado à composição e para ajudar na visualização da composição, especialmente nos casos em que o sedimento liofilizado seria difícil de ver. Os agentes de volume também podem ajudar a impedir uma explosão do(s) componente(s) ativo(s) de uma composição farmacêutica e/ou para auxiliar na crioproteção da composição. Os agentes de volume são bem conhecidos na técnica. Adequadamente, os agentes de volume aqui descritos não pretendem constituir uma lista exaustiva, mas são fornecidos apenas como agentes de volume exemplificativos que podem ser utilizados nas composições.

[0122] Agentes de volume exemplificativos podem incluir carboidratos, monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos, álcoois de açúcar, aminoácidos e ácidos de açúcar e combinações dos mesmos. Os agentes de volume de carboidratos

incluem, mas não estão limitados a, mono-, di- ou poli- carboidratos, amidos, aldoses, cetoses, amino-açúcares, gliceraldeído, arabinose, lipose, pentose, ribose, xilose, galactose, glicose, hexose, idose manose, talose, heptose, glicose, frutose, metil α-D-glucopiranosídeo, maltose, lactona, sorbose, eritrose, treose, arabinose, alose, altrose, gulose, idose, talose, eritrulose, ribulose, xilulose, psicose, tagatose, glucosamina, galactosamina, arabinanos, frutanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos, inulina, levano, fucoidano, carragenina, galactocarolose, pectinas, amilose, pululano, glicogênio, amilopectina, celulose, pustulano, quitinina, quitinina, quitinina condroitina, dermatano, ácido hialurônico, goma xantina, sacarose, trealose, dextrano e lactose. Os agentes de volume de álcool de açúcar incluem, mas não estão limitados a, alditóis, inositóis, sorbitol e manitol. Os agentes de volume de ácido de açúcar incluem, mas não estão limitados a, ácidos aldônicos, ácidos urônicos, ácidos aldáricos, ácido glucônico, ácido isoascórbico, ácido ascórbico, ácido glucárico, ácido glucurônico, ácido glucônico, ácido glucônico, ácido glucárico, ácido galacturônico, ácido manurônico, ácido neuramínico, ácidos pécticos e ácido algínico. Os agentes de volume de aminoácidos incluem, mas não estão limitados a, glicina, histidina e prolina.

[0123] Em algumas modalidades, um tensoativo pode ser incluído nas composições. Os tensoativos, em geral, reduzem a tensão superficial de uma composição líquida. Isso pode fornecer propriedades benéficas, como facilidade de filtragem melhorada. Os tensoativos também podem atuar como agentes emulsificantes e/ou solubilizantes. Os tensoativos são bem conhecidos na técnica. Por conseguinte, os tensoativos descritos neste documento não se destinam a constituir uma lista exaustiva, mas são fornecidos apenas como tensoativos exemplificativos que podem ser utilizados nas formulações ou composições da presente divulgação. Os tensoativos que podem ser incluídos incluem, entre outros, ésteres de sorbitano, como polissorbatos (por exemplo, polissorbato 20 e polissorbato 80),

lipopolissacarídeos, polietileno glicóis (por exemplo, PEG 400 e PEG 3000), poloxâmeros (por exemplo, plurônicos), etileno óxidos e óxidos de polietileno (por exemplo, Triton X-100), saponinas, fosfolipídeos (por exemplo, lecitina) e combinações dos mesmos.

[0124] Em algumas modalidades, um agente de encapsulação pode ser incluído nas composições. Os agentes de encapsulação podem sequestrar moléculas e ajudar a estabilizá-las ou solubilizá-las. Os agentes de encapsulação são bem conhecidos na técnica. Adequadamente, os agentes de encapsulação aqui descritos não pretendem constituir uma lista exaustiva, mas são fornecidos apenas como agentes de encapsulação exemplificativos que podem ser utilizados nas composições. Os agentes de encapsulação que podem ser incluídos nas composições incluem, entre outros, α-ciclodextrinas, β-ciclodextrinas, γ-ciclodextrina e combinações dos mesmos (por exemplo, α-ciclodextrina, dimetil-α-ciclodextrina, hidroxietil-α-ciclodextrina, hidroxipropil-α-ciclodextrina, trimetil-α-ciclodextrina, β-ciclodextrina, dimetil-β-ciclodextrina, hidroxietil-β-ciclodextrina, hidroxipropil-β-ciclodextrina, trimetil-β-ciclodextrina, γ-ciclodextrina, dimetil-γ-ciclodextrina, hidroxietil-γ-ciclodextrina, hidroxipropil-γ-ciclodextrina, trimetil-γ-ciclodextrina e combinações dos mesmos.

[0125] Em algumas modalidades, um agente de ajuste de tonicidade pode ser incluído nas composições. A tonicidade de uma composição líquida é uma consideração importante ao administrar a composição a um paciente, por exemplo, por administração parenteral. Agentes de ajuste de tonicidade, portanto, podem ser utilizados para ajudar a tornar uma composição adequada para administração. Os agentes de ajuste de tonicidade são bem conhecidos na técnica. Por conseguinte, os agentes de ajuste de tonicidade aqui descritos não pretendem constituir uma lista exaustiva, mas são fornecidos meramente como agentes de ajuste de tonicidade exemplificativos que podem ser utilizados nas composições. Os agentes de ajuste de tonicidade podem ser iônicos ou não iônicos e incluem, mas não estão limitados a,

sais inorgânicos, aminoácidos, carboidratos, açúcares, álcoois de açúcar e carboidratos. Sais inorgânicos exemplificativos podem incluir cloreto de sódio, cloreto de potássio, sulfato de sódio e sulfato de potássio. Um aminoácido exemplificativo é a glicina. Açúcares exemplificativos podem incluir álcoois de açúcar como glicerol, propileno glicol, glicose, sacarose, lactose, dextrose e manitol.

[0126] Em algumas modalidades, um agente de estabilização pode ser incluído nas composições. Agentes de estabilização ajudam a aumentar a estabilidade de um composto nas composições. Isso pode ocorrer, por exemplo, reduzindo a degradação ou impedindo a agregação de um composto. Sem desejar estar limitado pela teoria, os mecanismos para melhorar a estabilidade podem incluir o sequestro do composto a partir de um solvente ou a inibição da oxidação de radicais livres da substância terapeuticamente eficaz. Os agentes de estabilização são bem conhecidos na técnica. Adequadamente, os agentes de estabilização aqui descritos não pretendem constituir uma lista exaustiva, mas são fornecidos apenas como agentes de estabilização exemplificativos que podem ser utilizados nas composições. Os agentes de estabilização podem incluir, mas não estão limitados a, emulsificantes e tensoativos.

[0127] Em algumas modalidades, um protetor pode ser incluído nas composições. Protetores são agentes que protegem um ingrediente farmaceuticamente ativo (por exemplo, uma substância ou composto terapeuticamente eficaz) de uma condição indesejável (por exemplo, instabilidade causada por congelamento ou liofilização ou oxidação). Os protetores podem incluir, por exemplo, crioprotetores, lioprotetores e antioxidantes. Os crioprotetores são úteis na prevenção da perda de potência de um ingrediente farmacêutico ativo (por exemplo, um composto de antraciclina) quando uma composição é exposta a uma temperatura abaixo do seu ponto de congelamento. Por exemplo, um crioprotetor pode ser incluído em uma formulação liofilizada reconstituída, de modo que a

formulação possa ser congelada antes da diluição para administração intravenosa. Os crioprotetores são bem conhecidos na técnica. Adequadamente, os crioprotetores aqui descritos não pretendem constituir uma lista exaustiva, mas são fornecidos apenas como crioprotetores exemplificativos que podem ser utilizados nas composições. Os crioprotetores incluem, mas não estão limitados a, solventes, tensoativos, agentes encapsulantes, agentes estabilizadores, modificadores de viscosidade e combinações dos mesmos. Os crioprotetores podem incluir, por exemplo, dissacarídeos (por exemplo, sacarose, lactose, maltose e trealose), polióis (por exemplo, glicerol, manitol, sorbitol e dulcitol), glicóis (por exemplo, etileno glicol, polietileno glicol e propileno glicol).

[0128] Os lioprotetores são úteis na estabilização dos componentes de uma composição submetida à liofilização. Por exemplo, uma substância terapeuticamente eficaz pode ser liofilizada com um lioprotetor antes da reconstituição. Os lioprotetores são bem conhecidos na técnica. Adequadamente, os lioprotetores aqui descritos não pretendem constituir uma lista exaustiva, mas são fornecidos apenas como lioprotetores exemplificativos que podem ser utilizados nas composições. Os lioprotetores incluem, mas não estão limitados a, solventes, tensoativos, agentes encapsulantes, agentes estabilizadores, modificadores de viscosidade e combinações dos mesmos. Lioprotetores exemplificativos podem ser, por exemplo, açúcares e polióis. A trealose, sacarose, dextrano e hidroxipropil-beta-ciclodextrina são exemplos não limitativos de lioprotetores.

[0129] Os antioxidantes são úteis na prevenção da oxidação dos componentes de uma composição. A oxidação pode resultar na agregação de um medicamento ou em outros efeitos prejudiciais à pureza do produto de droga ou à sua potência. Os antioxidantes são bem conhecidos na técnica. Adequadamente, os antioxidantes aqui descritos não pretendem constituir uma lista exaustiva, mas são fornecidos apenas como antioxidantes exemplificativos que podem ser utilizados nas

composições. Os antioxidantes podem ser, por exemplo, ascorbato de sódio, citrato, tióis, metabissulfito e combinações dos mesmos.

[0130] Em algumas modalidades, um agente modificador de viscosidade pode ser incluído na composição. Modificadores de viscosidade alteram a viscosidade de composições líquidas. Isso pode ser benéfico porque a viscosidade desempenha um papel importante na facilidade com que uma composição líquida é filtrada. Uma composição pode ser filtrada antes da liofilização e reconstituição, ou após a reconstituição. Modificadores de viscosidade são bem conhecidos na técnica. Adequadamente, os modificadores de viscosidade aqui descritos não pretendem constituir uma lista exaustiva, mas são fornecidos apenas como antioxidantes exemplificativos que podem ser utilizados nas composições. Modificadores de viscosidade incluem solventes, agentes solubilizantes, tensoativos e agentes de encapsulação. Modificadores de viscosidade exemplificativos que podem ser incluídos em composições incluem, mas não estão limitados a *N*-acetil-DL-triptofano e *N*-acetil-cisteína.

Atividade antitumoral em modelos de camundongos xenoenxertos de tumores humanos

[0131] As pró-drogas de ligação à albumina AE-Ceto-Sulf07 e AE-Éster-Sulf07 demonstraram uma atividade antitumoral excepcional em linhagens de células tumorais, com IC_{50} das drogas livres AE-Ceto e AE-Éster na faixa picomolar (259 e 339 pM, respectivamente, comparável ao IC_{50} de 130 pM do composto parental AE - ver o Exemplo 4), bem como em vários modelos de xenoenxerto de tumor humano em camundongos nus, induzindo remissões parciais e completas em todo o xenoenxerto de tumor humano avaliado (ver exemplos nas Figuras 13-23) . Isso incluiu pequenos tumores com volumes iniciais na faixa de aproximadamente 130-170 mm^3 e também grandes tumores com volumes iniciais de até aproximadamente 380 mm^3. Além disso, na maioria dos casos, a terapia com as pró-drogas de ligação à

albumina AE-Ceto-Sulf07 e AE-Éster-Sulf07 induziu remissões a longo prazo e uma diminuição no Volume Relativo do Tumor (RTV). O composto parental auristatina E (AE) foi principalmente inativo nos modelos testados ou apenas mostrou inibição marginal do tumor. Procedimentos experimentais e os resultados nos modelos de camundongos portadores de tumores são descritos em detalhes no Exemplo 5 e Figuras 13-23.

Métodos de tratamento

[0132] Os compostos e composições aqui descritos são úteis para uma variedade de aplicações clínicas.

[0133] Os compostos e composições aqui descritos podem induzir inibição prolongada ou a longo prazo do crescimento do tumor. Em certas modalidades, a inibição prolongada ou a longo prazo do crescimento do tumor é sem perda de peso corporal ou qualquer ou simplesmente toxicidade marginal da medula óssea.

[0134] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método para o tratamento de uma doença maligna compreendendo administrar um paciente em necessidade de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica contendo um composto aqui descrito. Por exemplo, algumas modalidades incluem um método para tratar um paciente que sofre de uma doença selecionada de um câncer, uma doença viral, uma doença autoimune, uma doença inflamatória aguda ou crônica e uma doença causada por bactérias, fungos e outros micro-organismos, compreendendo administrar ao paciente em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de acordo com a presente divulgação.

[0135] A divulgação fornece métodos de tratamento de uma condição ou doença em um paciente, a referida condição ou doença selecionada de um câncer, uma doença viral, doença autoimune, doença inflamatória aguda ou crônica e uma doença causada por bactérias, fungos ou outros micro-organismos, compreendendo

administrar ao paciente um composto ou uma composição farmacêutica como aqui descrito.

[0136] Em algumas modalidades, o câncer é um câncer de sangue ou um câncer de tumor sólido. Em algumas modalidades, a doença é câncer e é selecionada de carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiplo ou melanoma.

[0137] Em algumas modalidades, o câncer é adenocarcinoma, melanoma uveal, leucemia aguda, neuroma acústico, carcinoma ampular, carcinoma anal, astrocitoma, basalioma, câncer pancreático, tumor do tecido conjuntivo, câncer de bexiga, carcinoma brônquico, carcinoma brônquico de células não pequenas, câncer de mama, linfoma de Burkitt, carcinoma de corpo, síndrome da CUP, câncer de cólon, câncer de intestino delgado, câncer de ovário, carcinoma endometrial, câncer de vesícula biliar, carcinomas de vesícula biliar, câncer uterino, câncer cervical, pescoço, nariz e tumores da orelha, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, câncer uretral, câncer de pele, gliomas, câncer testicular, sarcoma de Kaposi, câncer de laringe, câncer ósseo, carcinoma colorretal, tumores de cabeça/pescoço, carcinoma do cólon, craniofaringgeoma, câncer de fígado, leucemia, câncer de pulmão, câncer de pulmão de células não pequenas, linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, câncer de estômago, câncer de cólon, meduloblastoma, melanoma, meningioma, câncer de rim, carcinomas de células renais, oligodendroglioma, carcinoma de esôfago, carcinomas osteolíticos e carcinomas osteoplásticos, osteossarcoma, carcinoma de ovário, carcinoma de pâncreas, câncer de pênis, câncer de próstata, câncer de língua, carcinoma de ovário ou câncer de glândula linfática.

[0138] Algumas modalidades incluem um método para aumentar a concentração de um metabólito de um composto em um tumor, compreendendo administrar o composto de acordo com a presente divulgação.

Variações e modificações

[0139] Variações, modificações e outras implementações do que é descrito

aqui ocorrerão àqueles versados na técnica sem se afastar do espírito e do escopo da presente divulgação. Por conseguinte, a presente divulgação não deve ser limitada à descrição anterior ou aos exemplos a seguir.

Exemplificação

[0140] Com aspectos da presente divulgação agora sendo geralmente descritos, estes serão mais facilmente compreendidos por referência aos exemplos a seguir, que são incluídos apenas para fins de ilustração de certas características e modalidades da presente divulgação e não se destinam a ser limitativos.

Equivalentes

[0141] Aqueles versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de confirmar, usando não mais que experimentação de rotina, numerosos equivalentes aos compostos, composições e métodos de uso dos mesmos descritos aqui. Tais equivalentes são considerados dentro do escopo da presente divulgação.

Exemplos

Materiais e Métodos para preparação e análise de compostos

[0142] Todas as reações foram realizadas sob atmosfera inerte de nitrogênio, salvo indicação em contrário. Os reagentes comercialmente disponíveis foram utilizados sem purificação adicional, a menos que indicado de outra forma. Os solventes anidros foram adquiridos na forma anidra (diclorometano, dimetilsulfóxido, *N,N*-dimetilformamida, tetra-hidrofurano, etc.) e todos os outros solventes utilizados foram de grau reagente ou de HPLC ou LCMS.

[0143] As peças de vidro e as barras de agitação foram geralmente secas em um forno a 110°C por pelo menos 12 h e depois resfriadas sob atmosfera de nitrogênio antes do uso, quando aplicável. Todas as outras reações foram realizadas em frascos de fundo redondo vedados com septos de borracha. Seringas de plástico ou pipetas de vidro foram usadas para transferir reagentes líquidos. As reações foram agitadas magneticamente usando barras de agitação magnéticas revestidas com teflon. As

soluções orgânicas foram concentradas sob pressão reduzida usando um evaporador rotativo KNF RC 600 e Heidolph Hei-VAP.

[0144] A cromatografia em coluna flash foi realizada com cartuchos de gel de sílica flash pré-embalados Biotage® SNAP Ultra e SNAP Ultra C18, usando os sistemas de purificação flash Biotage® Isolera™ One e Biotage® Isolera™ SL (em grande escala).

[0145] O valor do pH de uma solução foi medido à temperatura ambiente usando um medidor de pH WTW Inolab 7310 com eletrodos SenTix® mic-D.

[0146] A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada usando um sistema Shimadzu Nexera XR HPLC equipado com um detector de matriz de fotodíodos SPD-M20A e foi monitorada a 220 nm, a menos que indicado de outra forma.

[0147] Os espectros de massa de baixa resolução (LRMS) foram coletados usando cromatografia líquida combinada com espectrometria de massa (LCMS) em um espectrômetro de vantagem Bruker Amazon SL ou Thermo Fisher LCQ (ionização por eletropulverização, ESI). Os espectros de massa de alta resolução (HRMS) foram registrados em um instrumento micrOTOF da Bruker usando uma ionização por cromatografia líquida por eletropulverização e espectrômetro de massa em tempo de voo (ESI-TOF). As análises elementares foram realizadas em um Leco TruSpec® CHNS Macro com um detector de IR para C, H e S; e com um detector de condutividade térmica (TCD) para N.

[0148] A liofilização foi realizada usando um liofilizador Martin Christ Alpha ou Epsilon 2-4 LSCplus.

[0149] A centrifugação foi realizada utilizando a centrífuga Eppendorf 5810 R, refrigerada, com Rotor A-4-81, 230 V/50 – 60 Hz.

[0150] O teor de ácido trifluoroacético (TFA) foi medido por cromatografia iônica e o teor de água foi medido por coulometria Karl Fischer (KF).

[0151] Os espectros de ressonância magnética nuclear (NMR) foram registrados à temperatura ambiente no espectrômetro de 400 MHz: Bruker Avance 400 Ultrashield (400 MHz em ^{1}H, 100 MHz em ^{13}C). Todos os valores para os desvios químicos dos prótons são relatados em partes por milhão (δ) e são referenciados aos prótons deuterados em DMSO-d_6 (δ 2,50). Todos os valores para trocas químicas de carbono são relatados em partes por milhão (δ) e são referenciados às ressonâncias de carbono em DMSO-d_6 (δ 39,52). Os dados de NMR são representados da seguinte forma: deslocamento químico, multiplicidade (s = singuleto, d = dupleto, t = tripleto, q = quarteto, p = penteto, m = multipleto, br = amplo, dd = dupleto de dupletos, td = tripleto de dupletos), constante de acoplamento = J (Hz = Hertz) e integração.

Métodos HPLC

[0152] Método 1: Método HPLC para intermediários de ligação e pureza Sulf07 do produto final. Coluna: Phenomenex Kinetex Polar C18 (150 x 4,6 mm, 2,6 µm, 100 Å), gradiente: fase móvel A: 95:5 acetato de amônio 10 mM pH 7,0: acetonitrila, fase móvel B: 95:5, acetonitrila: acetato de amônio 10 mM pH 7,0. Gradiente de eluição da fase B: 0-2,5 min: 0%, 2,5-18 min: 0-45%, 18-20 min: 45-75%, 20-24 min: 75%, 24-26 min: 75% - 0%, 26-30 minutos: 0%, 30 minutos: final do método, taxa de fluxo = 1,0 mL/min.

[0153] Método 2: método HPLC para o Exemplo 2 e Exemplo 3. Coluna: Phenomenex Kinetex Polar C18 (150 x 4,6 mm, 2,6 µm, 100 Å), gradiente: fase móvel A: 95:5 acetato de amônio 10 mM pH 7,0: acetonitrila, fase móvel B: 95:5, acetonitrila: acetato de amônio 10 mM pH 7,0. Gradiente de eluição da fase B: 0-0,5 min: 30%, 0,5-9 min: 30-95%, 9-11 min: 95%, 11-12,5 min: 95-30%, 12,5-15 min: 30%, 15 minutos: final do método, taxa de fluxo = 1,0 mL/min.

[0154] Método 3: Método LCMS para intermediários de ligação e produto final Sulf07. Coluna: Phenomenex Kinetex Polar C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm, 100 Å),

gradiente: fase móvel A: 95:5 acetato de amônio 10 mM pH 7,0: acetonitrila, fase móvel B: 95:5, acetonitrila: acetato de amônio 10 mM pH 7,0. Gradiente de eluição da fase B: 0-2,5 min: 0%, 2,5-18 min: 0-45%, 18-20 min: 45-75%, 20-24 min: 75%, 24-26 min: 75% - 0%, 26-30 minutos: 0%, 30 minutos: final do método. Taxa de fluxo = 0,4 mL/min.

[0155] Método 4: método LCMS para o Exemplo 2 e Exemplo 3. Coluna: Phenomenex Luna Omega Polar C18 (50 x 2,1 mm, 1,6 µm, 100 Å), gradiente: fase móvel A: 99,9:0,1 água: ácido fórmico, fase móvel B: 99,9:0,1 acetonitrila: ácido fórmico. Gradiente de eluição da fase B: 0-0,5 min: 20%, 0,5-3,5 min: 20-100%, 3,5-5,0 min: 100%, 5,0-5,5 min: 100-20%, 5,5-7,0 min: 20%, 7 minutos: final do método. Taxa de fluxo = 0,4 mL/min.

[0156] Método 5: Método LCMS para experiências de ligação ao plasma. Coluna: Phenomenex Kinetex Polar C18 (50 x 2,1 mm, 2,6 µm, 100 Å), gradiente: fase móvel A: 95:5 acetato de amônio 10 mM pH 7,0: acetonitrila, fase móvel B: 95:5, acetonitrila: acetato de amônio 10 mM pH 7,0. Gradiente de eluição da fase B: 0-1,0 min: 0%, 1,0-7,0 min: 0-75%, 7,0-7,5 min: 75-90%, 7,5-8,5 min: 90-0%, 8,5-10,0 min: 0 %, 10 minutos: final do método, taxa de fluxo = 0,4 mL/min.

[0157] Método 6: Método de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) para ligação ao plasma. Coluna: MabPac HIC-20 (250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å), gradiente: fase móvel A: 1,5M $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM Na_2HPO_4 pH 8,0, fase móvel B: 20 mM Na_2HPO_4 pH 8,0 e 20% de isopropanol. Gradiente de eluição da fase B: 0-2,0 min: 0%, 2,0-10,0 min: 0-50%, 10,0-13,0 min: 50-60%, 13,0-17,0 min: 60-100%, 17,0-20,0 min: 100 %, 20,0-25,0 min: 100-0%, 25,0-30,0 min: 0%, 30 minutos: final do método, taxa de fluxo = 1 mL/min.

[0158] Método 7: Método de HPLC para o perfil de estabilidade do pH do conjugado de droga com albumina. Coluna: Phenomenex Aeris WP C18 (250 x 4,6 mm, 3,6 µm, largura), gradiente: fase móvel A: tampão Tris 20 mM pH 8,0, fase móvel

B: UHPLC 90% acetonitrila e 10% água. Gradiente de eluição da fase B: 0-0,5 min: 25%, 0,5-2,5 min: 25-35%, 2,5-16,0 min: 35-85%, 16,0-17,0 min: 85-95%, 17,0-20,0 min: 95 %, 20,0-25,0 min: 95-25%, 25,0-30,0 min: 25%, 30 minutos: final do método, taxa de fluxo = 1,0 mL/min.

[0159] Método 8: método HPLC para degradação acelerada das formulações de API. Coluna: Phenomenex Kinetex Polar C18 (150 x 4,6 mm, 2,6 µm, 100 Å), gradiente: fase móvel A: 95:5 acetato de amônio 10 mM pH 7,0: acetonitrila, fase móvel B: 95:5, acetonitrila: acetato de amônio 10 mM pH 7,0. Gradiente de eluição da fase B: 0-2,5 min: 20%, 0,5-9 min: 20-75%, 9-11 min: 75%, 11-12,5 min: 75-20%, 12,5-15 min: 20%, 15 minutos: final do método, taxa de fluxo = 1,0 mL/min.

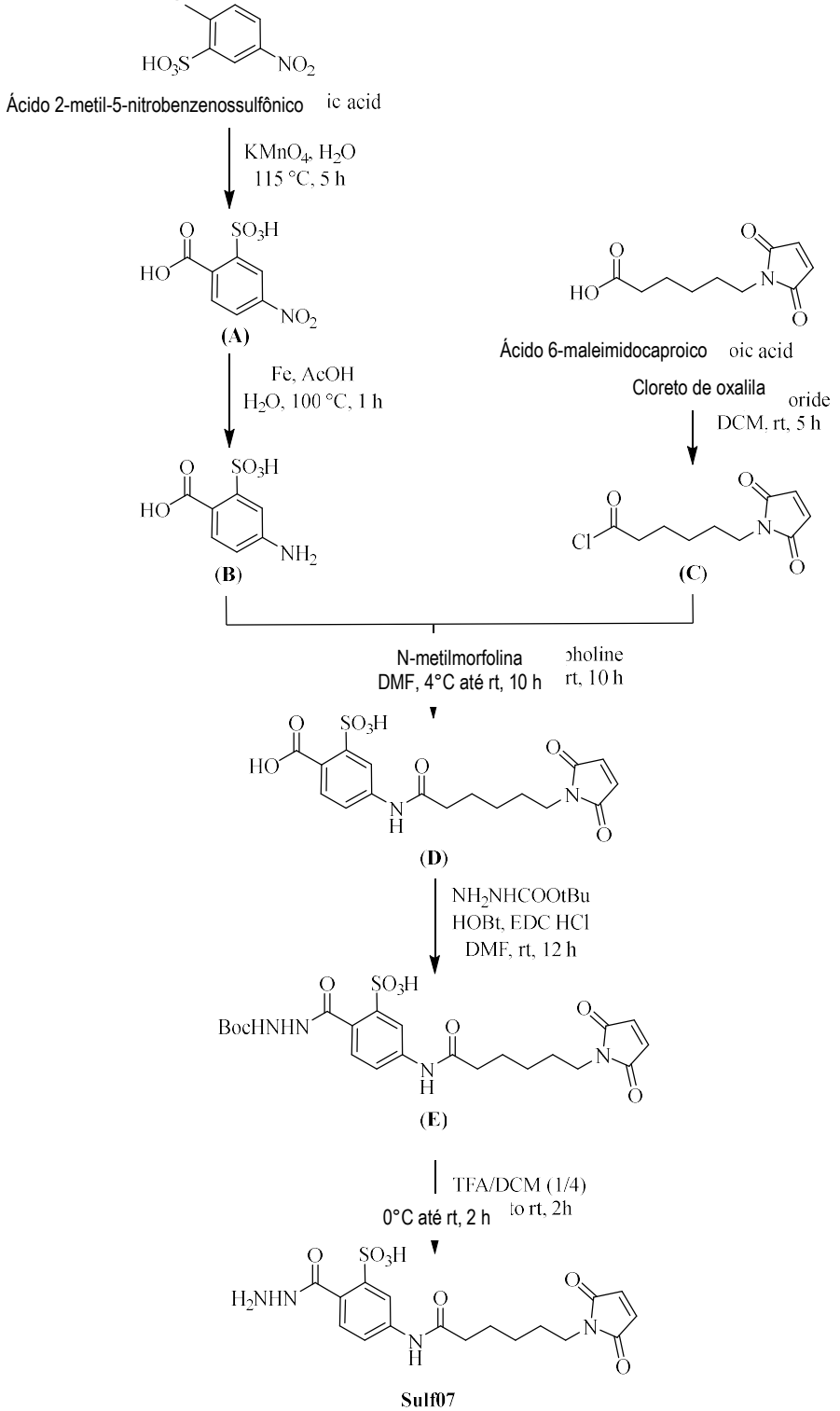
[0160] Método 9: Método HPLC para intermediários de ligação e pureza do Sulf07 do produto final preparado de acordo com a rota C. Coluna: Phenomenex Kinetex Polar C18 (150 x 4,6 mm, 2,6 µm, 100 Å), gradiente: fase móvel A: ácido trifluoroacético a 0,1% em H_2O, fase móvel B: ácido trifluoroacético a 0,1% em acetonitrila. Gradiente de eluição da fase B: 0-5,5 min: 1%, 5,5-20 min: 1-40%, 20-22 min: 40-65%, 22-24 min: 65%, 24-27 min: 65% - 1%, 27-30 minutos: 1%, 30 minutos: final do método, taxa de fluxo = 1,0 mL/min.

[0161] Método 10: Método HPLC para a pureza de AE-Ceto-Sulf07 preparado a partir do ligante Sulf07 obtido de acordo com a rota C. Coluna Kinetex Polar C18 (2,6 µm, 100 Å, 150 mm x 4,6 mm), gradiente: fase móvel A: 95:5 acetato de amônio 5 mM pH 7,0: metanol, fase móvel B: 95:5 metanol:acetato de amônio 5 mM pH 7,0. Gradiente de eluição da fase B: 0-2,5 min: 60%, 2,5-18 min: 60-80%, 18-22 min: 80-95%, 22-26 min: 95%, 26-30 min: final do método. Taxa de fluxo = 1,0 mL/min Forno da coluna: 37°C.

Exemplo 1

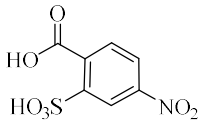
[0162] Sulf07, ácido 5-(6-(*2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il*) hexanamido)-2-(hidrazina-carbonil)-benzenossulfônico), foi preparado como descrito abaixo e

mostrado no esquema 1 de acordo com a rota A.



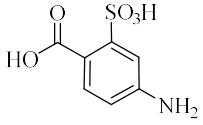
Esquema 1, Rota A

Síntese de ácido 4-nitro-2-sulfobenzoico (A)



[0163] A uma solução agitada de permanganato de potássio (72 g, 460 mmol, 4,5 equiv., Sigma Aldrich) em água Millipore (450 mL) foi adicionada em 10 segundos uma solução de hidrato de ácido 4-nitro-2-sulfônico (26 g, 102 mmol, 1,0 equiv., Abcr) em água Millipore (100 mL). A mistura roxa resultante foi agitada a 115 ºC por 5 h, que ficou marrom após esse período. HPLC (método 1, 220 nm) confirmou que a reação estava completa após 5 h. A mistura de reação foi resfriada até a temperatura ambiente. O sólido marrom formado durante a reação foi removido por filtração por sucção em uma almofada de Celite, lavado com água Millipore (300 mL) e a solução de filtrado marrom/amarelo foi concentrada para ~ 125 mL sob pressão reduzida a 40 ºC, acidificada lentamente com solução de HCl 5 M até se formar uma suspensão branca (~ pH 1). A suspensão branca foi então aquecida a 100 ºC até a obtenção de uma solução límpida que foi deixada repousar em um banho de gelo por 10 min até formar um sólido branco. O sólido branco foi obtido por filtração por sucção usando um filtro poroso (tamanho de poro 4). O sólido branco foi então seco sob alto vácuo durante 10 h para dar A. Rendimento: 18 g, 72%. Pureza por HPLC (método 1, 220 nm)> 95%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_7H_4NO_7S$ $[M-H]^-$: 245,98. Encontrado: 245,83.

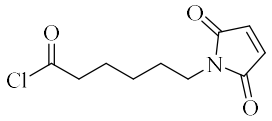
Síntese de ácido 4-amino-2-sulfobenzoico (B)



[0164] Uma suspensão agitada do ácido 4-nitro-2-sulfobenzoico A (13 g, 51 mmol, 1,0 equiv.) em água Millipore (75 mL) foi aquecida ao refluxo (120°C) até a dissolução completa. A essa temperatura foi adicionado ácido acético (7,2 mL, Sigma Aldrich), seguido de pó de ferro (9,5 g, 180 mmol, 3,5 equiv., Sigma Aldrich) que foi

adicionado em porções (~ 1 g/1,0 min) ao longo de 10 min para evitar uma reação exotérmica. A mistura de reação foi então deixada agitando sob refluxo por 1 h. Durante esse período, formou-se um sólido marrom e a análise por HPLC (método 1, 220 nm) confirmou que a reação estava completa. O sólido marrom foi removido por filtração por sucção diretamente em uma almofada de Celite (quando ainda quente) e foi posteriormente lavado com água quente (3 x 50 mL). O filtrado foi então filtrado através de papel de filtro Whatman (11 µm). O filtrado resultante foi concentrado sob pressão reduzida a 50 ºC até um volume de ~ 100 mL. Adicionou-se HCl concentrado gota a gota (~ 1 mL/2,0 min) até o pH 1 ser alcançado e um sólido branco/amarelo precipitar. A suspensão foi deixada a 4 ºC por 1 h. O sólido foi coletado por filtração por sucção usando um filtro poroso (tamanho de poro 4) e foi seco sob alto vácuo por 10 h para fornecer B como um sólido branco. Rendimento: 9 g, 81%. Pureza por HPLC (método 1, 220 nm)> 95%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_7H_4NO_5S$ $[M-H]^-$: 216,00. Encontrado: 216,16.

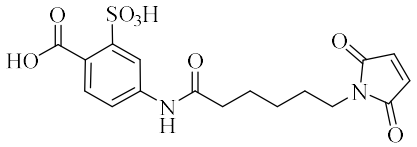
Síntese de cloreto de 6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil ou EMC-Cl (C)



[0165] A uma solução agitada de ácido 6-maleimidocaproico (EMC) (33 g, 156 mmol, 1,0 equiv., Alfa Aesar) em diclorometano seco (150 mL) à temperatura ambiente e sob atmosfera de nitrogênio foi adicionado em 30 minutos (~ 1 mL/2 min) cloreto de oxalil (15 mL, 171 mmol, 1,1 equiv., Sigma Aldrich) utilizando um funil de gota. *Cuidado: Evolução de gás foi observada durante o processo de adição.* A reação foi agitada à temperatura ambiente durante 5 h. A cor da solução da reação mudou para amarelo escuro durante o tempo de reação e a análise por HPLC (método 1, 220 nm) confirmou que a reação estava concluída após 5 h. O solvente foi removido sob pressão reduzida a 40 ºC para dar um óleo que foi seco sob alto vácuo durante a noite

resultando em um composto solidificado. O sólido acastanhado claro obtido foi triturado com uma espátula e seco por mais 20 h sob alto vácuo para dar C como um sólido microcristalino amarelo. O composto foi utilizado na próxima reação sem purificação adicional. Rendimento: 34 g, 95%. Pureza por HPLC (método 1, 220 nm) > 95% como o éster metílico. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{11}H_{16}NO_4$ (como metil éster) $[M+H]^+$: 226,10. Encontrado: 225,97.

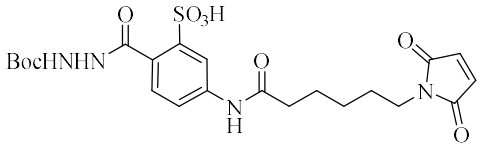
Síntese do ácido 4-(6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-2-sulfobenzoico (D)



[0166] B (18,5 g, 85 mmol, 1,0 equiv.) foi dissolvido em *N,N*-dimetilformamida anidra (300 mL) sob atmosfera de nitrogênio. A solução foi resfriada com um banho de gelo e deixada com agitação por 10 min para atingir 4 ºC. Em seguida, 4-metilmorfolina (18,69 mL, 170 mmol, 2,0 equiv., Sigma Aldrich) foi adicionada à solução resfriada gota a gota (~ 1 mL/3,5 min) dentro de 1 h usando um funil de gota. A mistura ficou marrom escuro quando a adição foi finalizada, e a esta mistura marrom escura foi adicionado gota a gota (~ 0,5 g/min) dentro de 1 h usando um funil de gota uma solução de C (29,28 g, 127 mmol, 1,5 equiv.) em *N,N*-dimetilformamida anidra (200 mL). Deixou-se a mistura de reação aquecer gradualmente até à temperatura ambiente durante a noite e depois deixou-se agitar à temperatura ambiente durante 10 h. Após conversão completa da reação, como indicado por HPLC (método 1, 220 nm), a solução da reação foi dispensada em tubos Falcon de 8 × 50 mL e foi centrifugada por 20 minutos a 10°C e 4.000 rpm. Os sobrenadantes foram removidos e os sólidos foram ressuspensos em 10 mL de *N,N*-dimetilformamida por cada tubo e centrifugados novamente por 20 minutos a 10 ºC e 4.000 rpm. Todos os sobrenadantes foram combinados e concentrados sob pressão reduzida a 50 ºC por 3 h para obter um sólido laranja claro (rendimento: 34 g, pureza por HPLC (método 1,

220 nm) 66%). Este sólido foi ressuspenso em metanol (250 mL), transferido para tubos Falcon de 8 × 50 mL e centrifugado por 20 minutos a 10°C e 4.000 rpm. Os sobrenadantes foram removidos e os sólidos foram ressuspensos em 5 mL de metanol por cada tubo e centrifugados novamente por 20 minutos a 10 ºC e 4.000 rpm. Todos os sólidos foram combinados e secos sob alto vácuo por 24 h para obter D como um sólido amarelo cristalino. Rendimento: 24 g, 37%. Pureza por HPLC (método 1, 220 nm) 97%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{17}H_{17}N_2O_8S$ $[M-H]^-$: 409,08. Encontrado: 409,13.

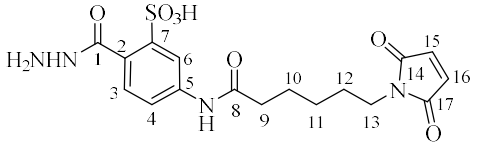
Síntese do ácido 2-(2-(terc-butoxicarbonil)hidrazina-1-carbonil)-5-(6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)benzenossulfônico ou Ligante protegido por BOC (E)



[0167] A uma solução de D (17 g, 41,4 mmol, 1,0 equiv.) em *N*-*N*-dimetilformamida (350 mL) sob atmosfera de nitrogênio foram adicionados cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodi-imida (EDC-HCl) (8,72 g, 45,5 mmol, 1,1 equiv., Roth) e hidroxibenzotriazol (HOBt) (6,15 g, 45,5 mmol, 1,1 equiv., Sigma Aldrich). A mistura de reação foi deixada agitar 30 min à temperatura ambiente e, em seguida *terc*-butil carbazato (7,12 g, 53,9 mmol, 1,3 equiv., Sigma Aldrich) foi adicionado e a solução passou de amarelo claro para uma cor avermelhada. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Após este período, a conversão completa da reação foi confirmada por HPLC (método 1, 220 nm). O solvente foi removido sob pressão reduzida a 40 ºC e depois sob alto vácuo à temperatura ambiente por 1 h, para proporcionar um óleo marrom-púrpura que foi purificado com sistema de purificação instantânea com dois cartuchos SNAP Ultra 340 g pré-embalados. A purificação foi realizada usando um sistema de gradiente linear,

de 100% de diclorometano a 90%/10% de diclorometano/metanol em 60 volumes de coluna. Os tubos contendo o produto desejado foram combinados e secos sob pressão reduzida a 40 ºC por 1 h e sob alto vácuo por mais 6 h para obter E como um sólido amarelo espumoso. Rendimento: 9 g, 17,1 mmol, 42%. HPLC (método 1, 220 nm) > 95%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{22}H_{27}N_4O_9S$ $[M-H]^-$: 523,16. Encontrado: 523,15.

Síntese do ligante Sulf07, ácido 5-(6-2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazinocarbonil)benzenossulfônico

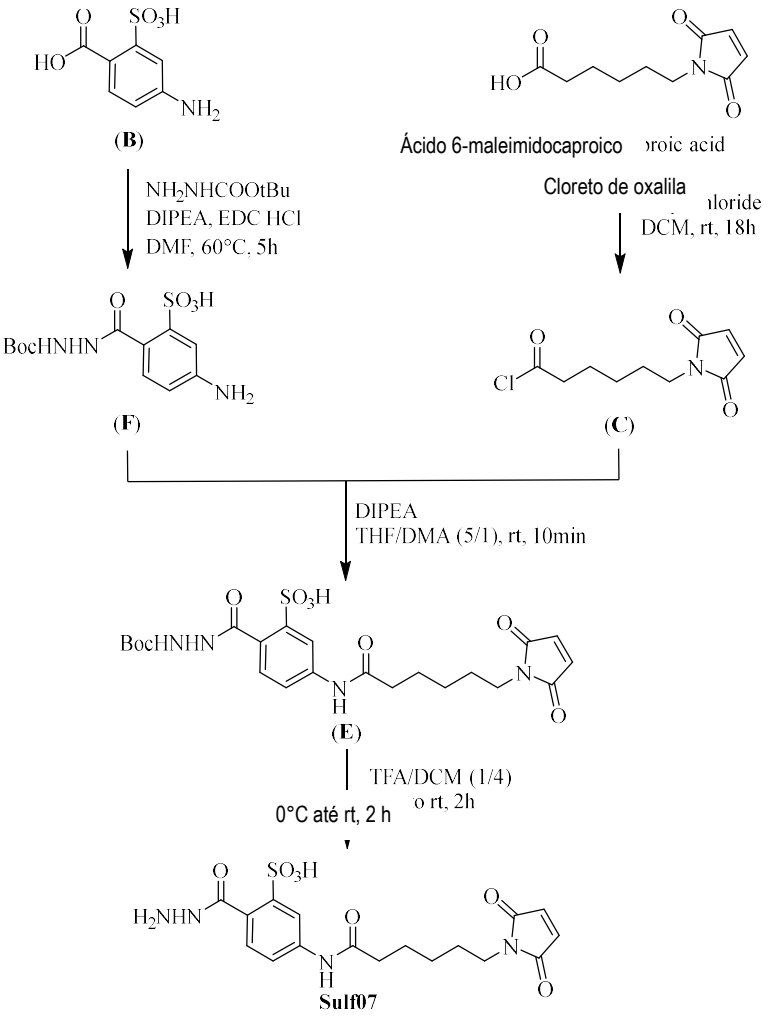


[0168] A uma solução amarela de E (10,2 g, 19,4 mmol, 1,0 equiv.) em diclorometano anidro (30 mL), que foi resfriado a 4-5 ºC, foi adicionado gota a gota (~ 1 mL/2,0 min), em 30 minutos, ácido trifluoracético (15 mL, Roth). Após a adição, o banho frio foi removido e a mistura de reação foi deixada agitar à temperatura ambiente durante 3 h. Após este tempo, a conclusão da reação foi confirmada por HPLC (método 1, 220 nm). A mistura de reação foi vertida gota a gota em 6 tubos Falcon, cada um contendo ~ 35 mL de éter dietílico frio. Um precipitado branco se formou imediatamente. Os tubos foram deixados em repouso a 4 ºC por 3 h. Após centrifugação dos tubos Falcon por 20 minutos a 10 ºC e 4000 rpm, os sobrenadantes foram removidos e os sólidos foram ressuspensos em 5 mL de éter dietílico por cada tubo e centrifugados novamente (4000 rpm, 20 min, 10 ºC) . Os sobrenadantes foram removidos novamente e os sólidos foram coletados e secos sob alto vácuo por 20 h para proporcionar o ligante Sulf07 como um sólido microcristalino branco. Rendimento: 10 g, 23,6 mmol, 96%. HPLC (método 1, 220 nm) > 95%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{17}H_{21}N_4O_7S$ $[M+H]^+$: 425,11. Encontrado: 425,07. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{17}H_{19}N_4O_7S$ $[M-H]^-$: 423,11. Encontrado: 423,12. HRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{17}H_{21}N_4O_7S$ $[M+H]^+$: 425,1125. Encontrado: 425,1125. LRMS-

ESI (*m/z*) calculado para $C_{17}H_{19}N_4O_7S$ $[M-H]^-$: 423,0978. Encontrado: 423,0980.

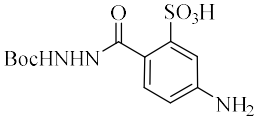
[0169] A estrutura do ácido 5-6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)hexa-anamido)-2-(hidrrazina-carbonil)benzenossulfônico, Sulf07, foi confirmada por 1H NMR: ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11,94 (s, 1H; C1-NH), 10,27 (s, 1H; C8-NH), 8,01 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H; C4-CH), 7,93 (dd, *J* = 8,5, 2,2 Hz, 1H; C6-CH), 7,68 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H; C7-CH), 7,00 (s, 2H; C15-CH, C16-CH), 3,40 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H; C13-CH_2), 2,32 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H; C9-CH_2), 1,60 (p, *J* = 7,5 Hz, 2H; C10-CH_2), 1,52 (p, *J* = 7,2 Hz, 2H; C12-CH_2), 1,26 (q, *J* = 8,8 Hz, 2H; C11-CH_2); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172,20 (C8), 171,54 (C14, C17), 167,59 (C1), 145,73 (C5), 142,09 (C3), 134,90 (C15, C16), 132,09 (C7), 123,79 (C2), 119,44 (C6), 117,47 (C4), 37,42 (C13), 36,65 (C9), 28,22 (C12), 26,21 (C11), 24,90 (C10). Análise elementar calculada para $C_{17}H_{21}N_4O_7S$; C, 45,71; H, 4,26; N, 11,85; S, 6,78. Encontrado: C, 46,2917; H 4,4836; N 12,8879; S 6,7886. Teor de TFA < 2% (p/p).

[0170] Sulf07, ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazina-carbonil)-benzenossulfônico, foi preparado como descrito abaixo e mostrado no esquema 2 de acordo com a rota B.



Esquema 2, Rota B

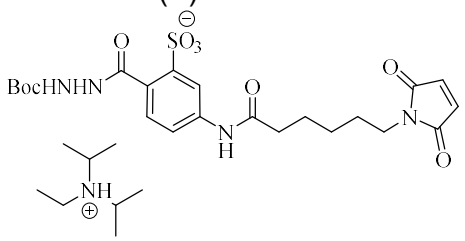
Síntese do ácido 5-amino-2-(2-(terc-butoxicarbonil)hidrazina-1-carbonil)benzenossulfônico (F)



[0171] A uma suspensão de ácido 4-amino-2-sulfobenzoico B (50,00 g, 230,20 mmol, 1,00 equiv.) em *N,N*-dimetilformamida anidra (DMF, 1000 mL) foi adicionada *N,N*-di-isopropiletilamina (DIPEA, 40,20 mL, 29,75 g, 230,20 mmol, 1,00 equiv.) durante 5 minutos. Adicionou-se EDC-HCl (48,54 mg, 253,21 mmol, 1,10 equiv.) e a mistura foi agitada a 23 ºC por 30 min. *terc*-Butil carbazato (33,46 g, 253,18 mmol, 1,10 equiv.) foi então adicionado e a mistura foi aquecida até 70 ºC e agitado durante

2 h. A segunda porção de EDC-HCl (24,31 g, 126,68 mmol, 0,55 equiv.) e *terc*-butil carbazato (16,76 mg, 126,68 mmol, 0,55 equiv.) foram adicionados e a mistura de reação foi ainda agitada a 70 ºC por 14 h. A reação foi resfriada para 23 ºC e filtrada através de Celite® 545 (100 g). O Celite® 545 foi adicionalmente lavado com 700 mL de metanol. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e purificado pelo sistema de purificação instantânea usando sete cartuchos SNAP Ultra 340 g pré-embalados. A purificação foi realizada utilizando um sistema de gradiente linear, de 100% de diclorometano a 70% de diclorometano/30% de metanol para dar o composto do título F como um sólido branco. Rendimento: 32,50 g, 98,09 mmol, 42,6%, HPLC (método 1, 220 nm)> 97%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{12}H_{16}N_3O_6S$ $[M-H]^-$: 330,08. Encontrado: 330,17.

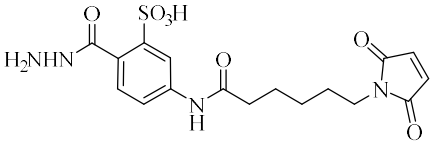
Síntese de *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-amínio 2-(2-(terc-butoxi-carbonil)hidrazina-1-carbonil)-5-(6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-)hexanamido) benzenossulfonato (E)



[0172] A uma solução de F (26,97 g, 81,40 mmol, 1,00 equiv.) em uma mistura de dimetilacetamida anidra (110 mL) e tetra-hidrofurano anidro (THF, 275 mL) foi adicionada uma solução de cloreto de ácido 6-maleimidocaproico C (26,60 g, 115,82 mmol, 1,42 equiv.) em tetra-hidrofurano anidro (165 mL) em uma porção à temperatura ambiente. A solução de reação clara foi agitada à temperatura ambiente durante 10 min. A mistura de reação foi então adicionada sob agitação em dois frascos cônicos de 2 L, cada um contendo éter di-isopropílico (1100 mL) e DIPEA (10,15 mL). Uma vez assentado o óleo, o sobrenadante foi cuidadosamente derramado e o óleo foi lavado com éter di-isopropílico (2 x 100 mL), dissolvido em metanol, combinado e

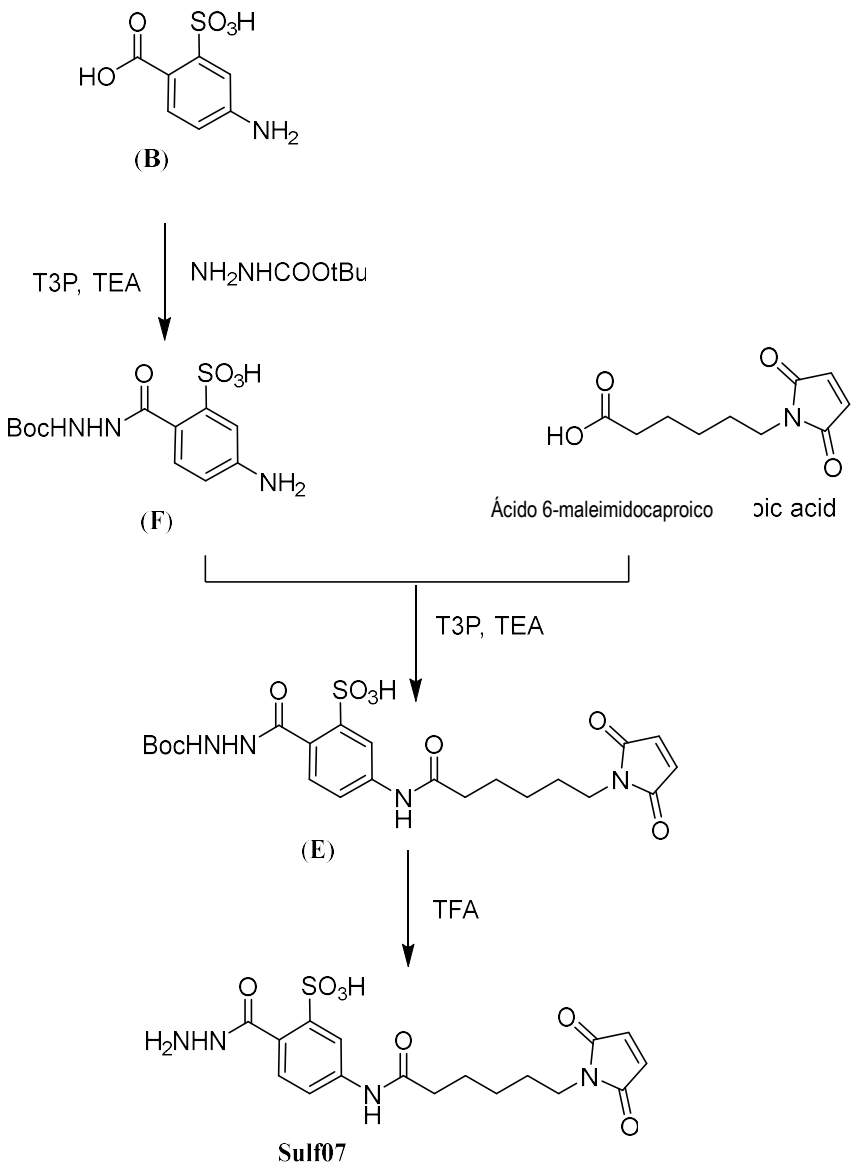
o solvente foi removido sob alto vácuo. O óleo resultante foi purificado pelo sistema de purificação instantânea usando seis cartuchos SNAP Ultra 340 g pré-embalados. A purificação foi realizada utilizando um sistema de gradiente linear, de 100% de diclorometano a 80% de diclorometano/20% de metanol para dar o composto do título E como um sólido branco. Rendimento: 24,00 g, 36,71 mmol, 45,1%, HPLC (método 1, 220 nm)> 95%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{22}H_{27}N_4O_9S$ $[M-H]^-$: 523,15. Encontrado: 523,30.

Síntese do ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazinocarbonil)benzenossulfônico (Sulf07)



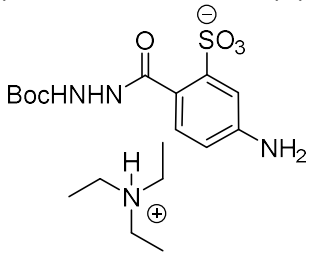
[0173] A uma solução fria (4°C) de E, (21,00 g, 32,12 mmol, 1,00 equiv.) em diclorometano (150 mL) foi adicionado ácido trifluoroacético (25,00 mL, 37,25 g, 326,70 mmol, 10,17 equiv.) durante 1 h . A reação foi então deixada aquecer gradualmente (mais de 30 minutos) até a temperatura ambiente e agitada por 1 h. A mistura de reação foi adicionada gota a gota *via* um funil de separação durante 1 h a um frasco cônico de 2 L contendo éter di-isopropílico (1,4 L) a 0°C. O sólido branco resultante foi filtrado através de um funil de porosidade 4 Å e lavado sequencialmente com diclorometano (2 × 1000 mL) e éter di-isopropílico (2 × 1000 mL). O sólido foi deixado secar no funil poroso durante a noite à temperatura ambiente. Secagem adicional foi realizada em alto vácuo a 25 ºC por 2 h. O produto final Sulf07 foi obtido como um sólido branco. Rendimento: 13,58 g, 32,00 mmol, 99,6%, HPLC (método 1, 220 nm)> 96%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{17}H_{19}N_4O_7S$ $[M-H]^-$: 423,10. Encontrado: 423,21.

[0174] Sulf07, ácido 5-(6-(*2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il*)hexanamido)-2-(hidrazina-carbonil)-benzenossulfônico, foi preparado como descrito abaixo e mostrado no esquema 2 de acordo com a rota C.



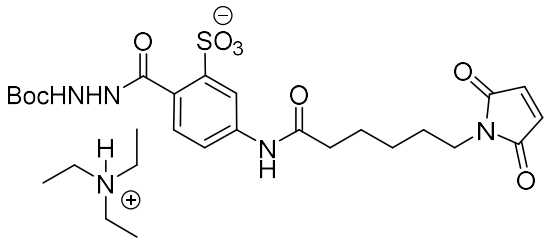
Esquema 2, rota C

Síntese do ácido 5-amino-2-(2-(terc-butoxicarbonil)hidrazina-1-carbonil)benzenossulfônico (F)



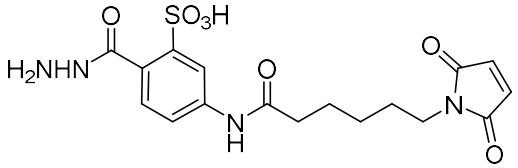
[0175] A uma suspensão de B (30,00 g, 138,12 mmol, 1,00 equiv.) em acetonitrila anidro (600 mL) foi adicionada trietilamina (41,93 g, 57,76 mL, 414,37 mmol, 3,00 equiv.) e a mistura foi agitada por 10 min. Depois, foi adicionado *terc*-butil carbazato (27,38 g, 207,19 mmol, 1,50 equiv.) foi adicionado e a mistura foi resfriada a -35°C. A essa temperatura, solução de anidrido propilfosfônico, T3P, (114,27 g, 106,79 mL, 179,56 mmol, 50% de sol. em acetato de etil, 1,3 equiv.) foi adicionado gota a gota durante 1 h. A reação foi agitada a -35°C por 2 h. A mistura foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e filtrada através de Celite® 545 (100 g). O Celite® foi adicionalmente lavado com acetonitrila (500 mL). Ambos os filtrados foram combinados e concentrados para 250 mL. A solução foi dividida igualmente em 6 porções e o solvente foi removido sob pressão reduzida. Cada porção foi dissolvida em diclorometano contendo 1%Et_3N (50 mL) e purificada por cromatografia flash NP em um sistema de purificação Biotage Isolera™ One Flash, com uma coluna SNAP Ultra 340 g pré-embalada, usando um gradiente de etapa de 2% a 12% metanol (contendo 1% de NEt_3) em DCM (contendo 1% NEt_3) em 7 volumes de coluna. Então, as frações purificadas de todas as porções foram combinadas, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o sólido foi seco sob alto vácuo para dar o composto do título F como um sólido esbranquiçado. Rendimento: 53,25 g, 108,0 mmol, 78,2% (NMR em DMSO-d 6 mostrou a presença de 1,6 eq. de trietilamina). HPLC (método 9, 220 nm) > 99%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{12}H_{16}N_3O_6S$ $[M-H]^-$: 330,08. Encontrado: 330,08.

Síntese de *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-amínio 2-(2-(terc-butoxi-carbonil)hidrazina-1-carbonil)-5-(6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-)hexanamido) benzenossulfonato (E)



[0176] A uma mistura de F (45,00 g, 91,24 mmol, 1,00 equiv.) e ácido 6-maleimidocaproico (19,27 g, 91,24 mmol, 1,00 equiv.) foi adicionado, acetonitrila (450 mL), trietilamina (13,85 g, 19,08 mL, 136,86 mmol) e T3P (43,55 g, 40,70 mL, 136,86 mmol, 50% sol. em acetato de etil) foram adicionados em uma porção à temperatura ambiente. A solução foi agitada à temperatura ambiente durante 24 h. O solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto bruto foi então purificado pelo sistema de purificação flash usando sete cartuchos SNAP Ultra 340 g pré-embalados, executando um gradiente linear de 2% de metanol a 15% de metanol em diclorometano para dar o composto do título E como um sólido esbranquiçado. Rendimento: 30,55 g, 53,5% (NMR em DMSO-d6 mostrou a presença de 1,1 eq. de trietilamina). HPLC (método 9, 220 nm) > 99%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{22}H_{27}N_4O_9S$ $[M-H]^-$: 523,15. Encontrado: 523,26.

Síntese do ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazinocarbonil)benzenossulfônico (Sulf07)

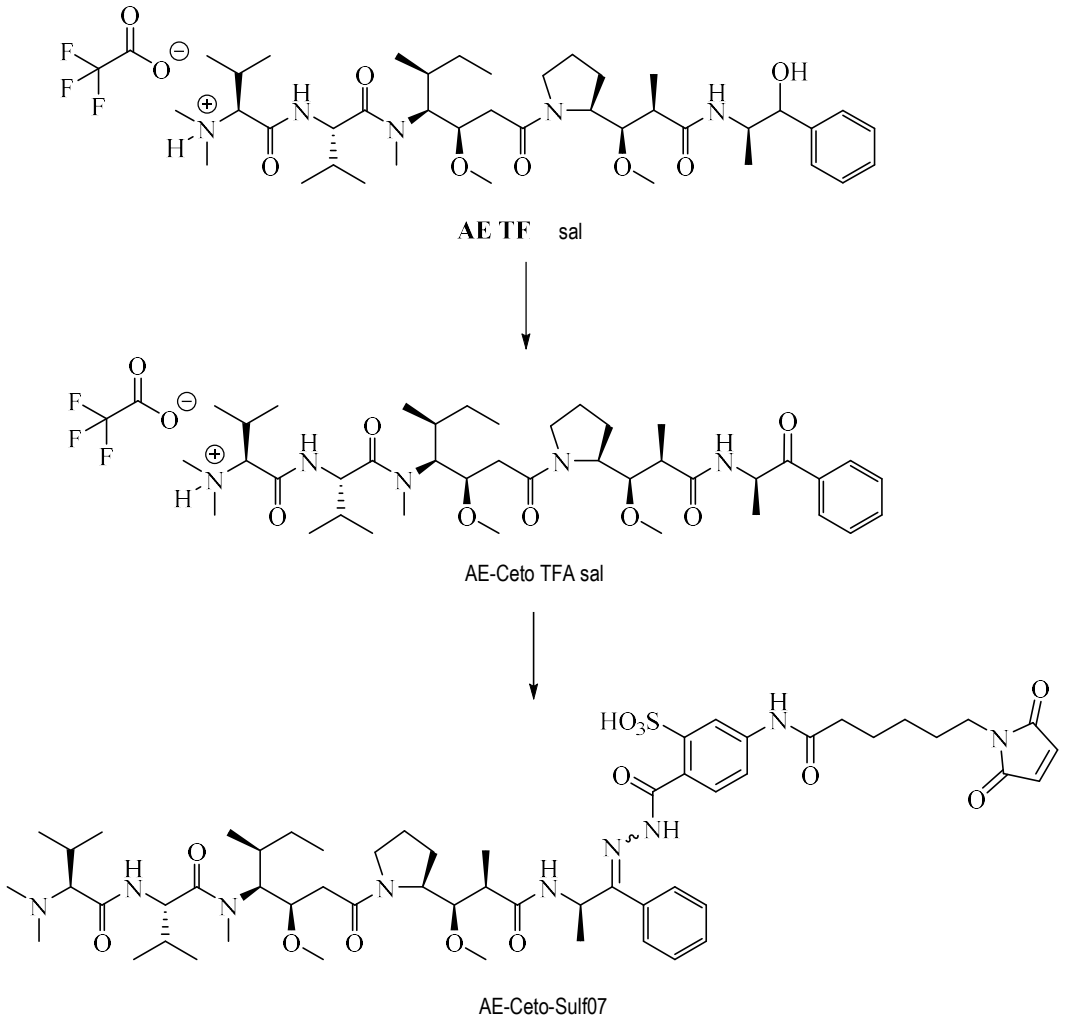


[0177] A uma suspensão fria (4°C) de E, (10,00 g, 15,98 mmol, 1,00 equiv.) em diclorometano (50 mL) foi adicionado ácido trifluoroacético (18,22 g, 12,31 mL, 159,81 mmol, 10,17 equiv.) durante 15 min. A mistura foi ainda agitada a 4°C por 15 minutos, e depois deixada aquecer gradualmente até a temperatura ambiente e agitada por 150 min. A mistura de reação foi adicionada gota a gota *via* um túnel de separação para um solução agitada de metil *terc*-butil éter, MTBE, (400 mL) e

diclorometano (200 mL). O sólido branco resultante foi filtrado através de um funil de porosidade 4 Å e lavado sequencialmente com diclorometano (2 × 150 mL) e MTBE (1 × 50 mL), MeOH (1 × 50 mL) e novamente MTBE (2 x 150 mL). O sólido foi deixado secar no funil poroso durante a noite à temperatura ambientepor 10 min. Secagem adicional foi realizada em alto vácuo a 25 °C por 18 h. O produto final Sulf07 foi obtido como um sólido amarelo . Rendimento: 5,786 g, 13,63 mmol, 98,7%, HPLC (método 9, 220 nm) > 96%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{17}H_{19}N_4O_7S$ $[M-H]^-$: 423,10. Encontrado: 422,95.

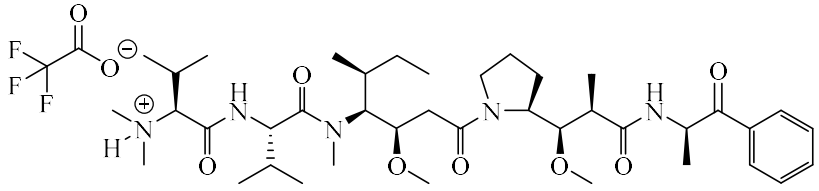
Exemplo 2

[0178] Composto AE-Ceto-Sulf07, 2-(2-((R)-2-((2R,3R)-3-(S)-1-((3R, 4S, 5S)-4-(S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metil-heptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-1-fenilpropilideno)hidrazina-1-carbonil)-5-(6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)benzenossulfônico foi sintetizado como descrito abaixo e mostrado no esquema 5.



Esquema 5

Síntese de, (S)-1-(((S)-1)(((3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((R)-1-oxo-1-fenilpropan-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxo-heptan-4-il)(metil) amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-*N*,*N*,3-trimetil-1-oxobutan-2-amínio 2,2,2-trifluoroacetato (sal de AE-Ceto TFA)



Via A: Síntese de acordo com um procedimento aprimorado da patente US6884869-B2

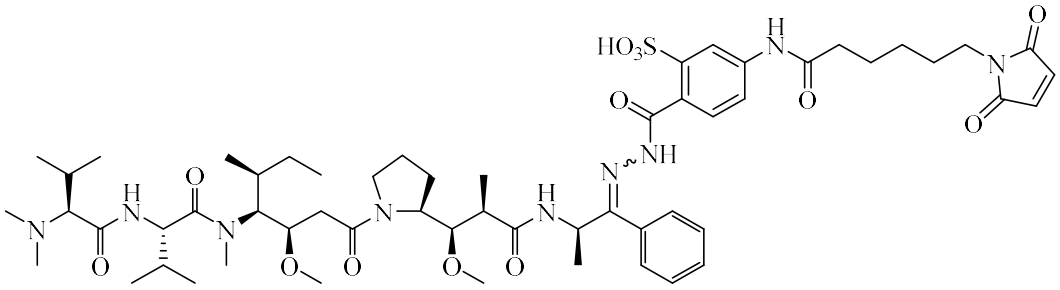
[0179] Adicionou-se clorocromato de piridínio (PCC) (382 mg, 1,772 mmol, 1,5 equiv., Sigma Aldrich) a uma solução de sal de auristatina E TFA (1000 mg, 1,183 mmol, Levena Biopharma) em diclorometano anidro (30 mL) sob atmosfera de nitrogênio. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 17 h. LC-MS (método 4, modo positivo) mostrou conversão completa do material de partida. A mistura de reação foi diluída com 25 mL de diclorometano e lavada com solução salina (3x20 mL). A fase aquosa foi extraída uma vez com diclorometano (20 mL). As fases orgânicas combinadas foram evaporadas sob pressão reduzida a 40°C. O resíduo foi dissolvido em 7,5 mL de acetonitrila e purificado por cromatografia flash RP com um cartucho SNAP Ultra C18 de 30 g pré-embalado, usando um gradiente de etapa de 2% a 40% de acetonitrila (+ 0,1% de TFA) em água (+ 0,1% de TFA) mais de 16 volumes de coluna. As frações puras do produto foram reunidas, a acetonitrila foi removido sob pressão reduzida a 40°C e o solvente residual foi liofilizado para dar um sólido branco. Rendimento: 530 mg, 53%. RP-HPLC (método 2, 220 nm): > 95%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{40}H_{68}N_5O_7$ $[M+H]^+$: 730,51. Encontrado: 730,34.

Via B: Síntese usando agente oxidante ligado a polímero

[0180] O IBX-poliestireno (1,13 g, 4,5 eq, 1,34 mmol, carregando 1,18 mmol/g, Merck Novabiochem) foi suspenso em diclorometano anidro (7,5 mL) e agitado suavemente por 15 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionado sal de AE TFA (250 mg, 295,51 µmol, Sage Chemical Co.) dissolvido em diclorometano anidro (5 mL) e a mistura foi agitada suavemente à temperatura ambiente. Após 21 h, foi observada a conversão completa do material de partida no produto por HPLC (método 2, 220 nm). A resina foi removida por filtração em papel de filtro dobrado (grau 3 hw, Sartorius), lavada com diclorometano e os filtrados combinados foram evaporados até a secura sob pressão reduzida a 40°C. O resíduo oleoso foi triturado com éter dietílico, formando um precipitado esbranquiçado que foi seco sob alto vácuo, produzindo um sólido esbranquiçado e espumoso. Rendimento: 171 mg, 69%, HPLC (método 2, 220

nm)> 99%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{40}H_{68}N_5O_7$ $[M+H]^+$: 730,51. Encontrado: 730.69; calculado para $C_{40}H_{66}N_5O_7$ $[M-H]^-$: 728,50. Encontrado: 728,79.

Síntese de 2-(2-((R)-2-((2R,3R)-3-(S)-1-((3R, 4S, 5S)-4-(S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metil-heptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-1-fenilpropilideno)hidrazina-1-carbonil)-5-(6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)benzenossulfônico (AE-Ceto-Sulf07)



[0181] Síntese 1: Sob nitrogênio, sal de AE-Ceto TFA (200 mg, 236,96 µmol) foi dissolvido em etanol anidro (6 mL), seguido pela adição de peneiras moleculares (esferas de 0,3 nm, 3A). Sulf07 (201 mg, 473,92 µmol, 2 equiv.) dissolvido em dimetilsulfóxido anidro (1,5 mL), foi adicionado. A solução amarela foi agitada à temperatura ambiente. Amostras para análises por HPLC/LC-MS (métodos 2 e 4, 220 nm) foram coletadas após 24 e 44 h. Após a conversão (85% após 44 h), a mistura foi filtrada através de um filtro de seringa de 0,2 µm de PVDF, a maior parte do etanol foi removida sob pressão reduzida. Foram adicionados gota a gota 3 mL de fosfato de sódio 200 mM, pH 7,2, até o pH da solução ser ~ 6. A solução (~ 5 mL) foi purificada por cromatografia flash RP com um cartucho SNAP Ultra C18 de 30 g pré-embalado, usando um gradiente de etapa de 2% a 50% de acetonitrila em água em 16 volumes de coluna. As frações do produto foram analisadas por HPLC (método 2, 220 nm), frações puras combinadas, acetonitrila foi removida sob pressão reduzida e a solução residual foi liofilizada para dar um sólido leve esbranquiçado. Rendimento: 113 mg, 42%, ponto de fusão: > 105°C. HPLC (método 2, 220 nm) > 95%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{57}H_{86}N_9O_{13}$ $[M+H]^+$: 1136,61. Encontrado: 1136.76; calculado para

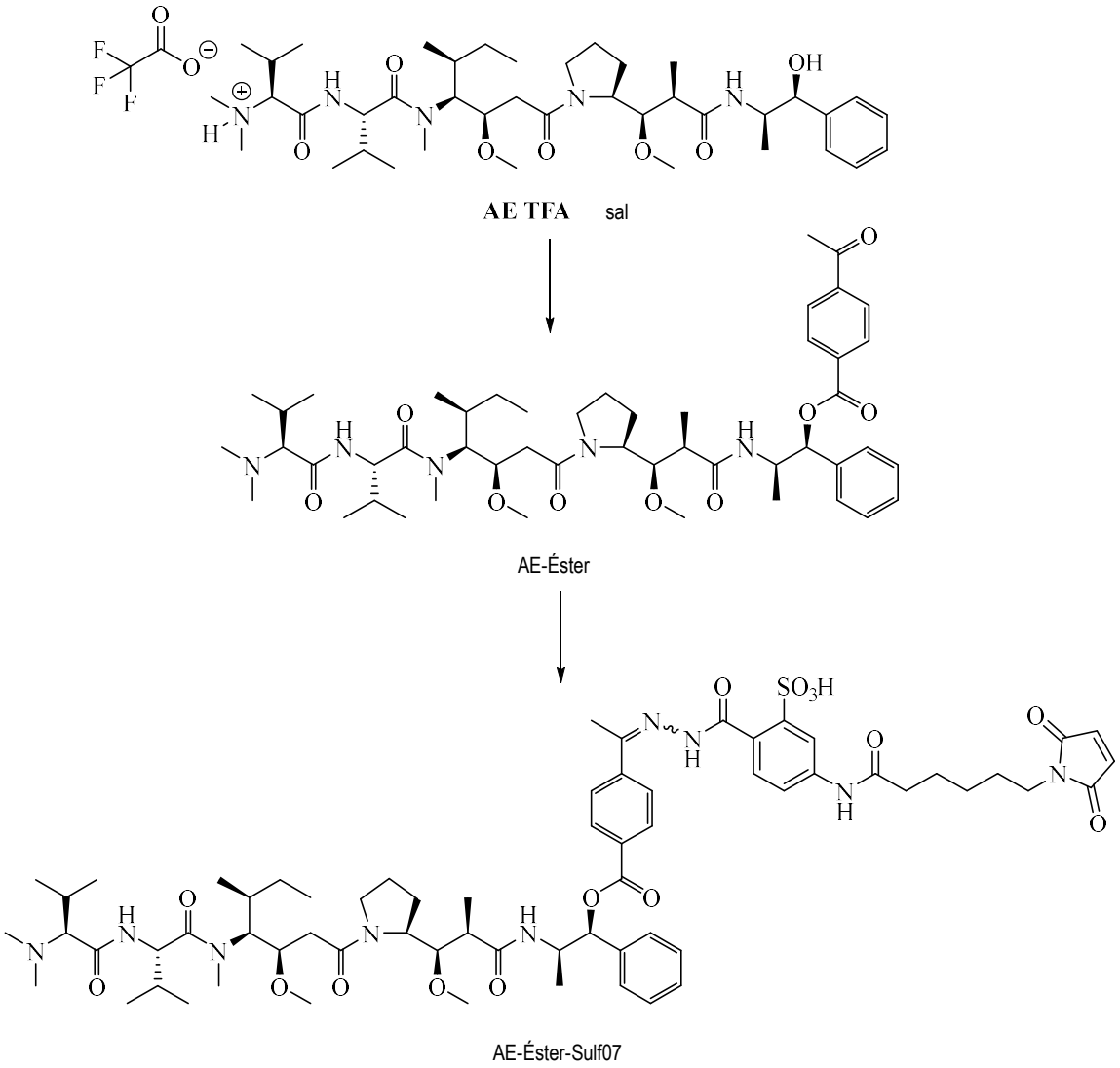
$C_{57}H_{84}N_9O_{13}$ [M-H]$^-$: 1134,59. Encontrado: 1135,09. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11,21 (2 x s, 1H), 10,09 (2 x s, 1H), 8,66 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 8,20 (2 x d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,84 - 7,69 (m, 2H), 7,50 - 7,41 (m, 1H), 7,35 - 7,21 (m, 5H), 6,98 (s, 2H), 4,96 - 4,84 (m, 1H), 4,77 - 4,60 (m, 1H), 4,56 (td, *J* = 8,6, 2,2 Hz, 1H), 4,03 - 3,92 (m, 1H), 3,61 - 3,52 (m, 1H), 3,51 - 3,41 (m, 2H), 3,38 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,35 - 3,32 (m, 1H), 3,20 (m, 7H), 3,02 (2 x s, 3H), 2,61 (2 x s, 6H), 2,47 - 2,37 (m, 1H), 2,26 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 2,22 - 2,04 (m, 3H), 2,04 - 1,91 (m, 1H), 1,88 - 1,63 (m, 3H), 1,62 - 1,43 (m, 7H), 1,37 - 1,27 (m, 4H) , 1,27 - 1,19 (m, 2H), 1,06 (d, *J* = 6,6 Hz, 2H), 0,98 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H), 0,96 - 0,88 (m, 8H), 0,87 - 0,81 (m, 5H), 0,80 - 0,73 (m, 5H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172,67, 172,38, 172,26, 171,47, 171,45, 171,13, 171,10, 168,76, 168,52, 166,64, 166,23, 164,82, 164,61, 156,63, 155,75, 144,76, 144,68, 140,27, 140,14, 134,46, 133,00, 131,89, 131,79, 128,78, 128,56, 128,40, 128,31, 127,66, 127,61, 127,10, 120,25, 118,66, 118,56, 116,47, 116,34, 85,45, 81,38, 77,69, 76,74, 71,91, 60,94, 60,20, 58,57, 58,16, 57,05, 55,07, 54,48, 54,39, 49,25, 48,86, 47,18, 46,24, 43,58, 43,12, 41,50, 41,44, 37,15, 36,96, 36,15, 35,01, 31,83, 31,57, 30,04, 29,94, 27,77, 26,68, 26,64, 25,76, 25,39, 25,27, 24,52, 24,50, 24,29, 23,17, 19,30, 19,28, 18,85, 18,62, 18,57, 18,48, 18,20, 17,17, 16,92, 15,58, 15,51, 15,23, 14,96, 10,43, 10,25. Nota: Alguns sinais de ^{1}H-NMR são divididos em dois sinais diferentes devido à presença de conformes na solução. Por esse motivo, o número de picos no espectro ^{13}C-NMR é maior que o número de carbonos esperado para AE-Ceto-Sulf07.

[0182] <u>Síntese 2:</u> Em um frasco de fundo redondo de 25 mL sob nitrogênio, AE-Ceto (150 mg, 0,177 mmol, 1,0 equiv) e Sulf07 obtidos da via C (93 mg, 0,213 mmol, 1,2 equiv) foram dissolvidos em uma mistura de EtOH anidro (225 µL) e DMSO anidro (225 µL). A dissolução completa foi alcançada após 5 minutos de ultrassom à temperatura ambiente. Peneiras moleculares ativadas foram adicionadas e a suspensão amarela resultante foi agitada à temperatura ambiente, e o progresso foi verificado por análise por HPLC. Após 22 h, a mistura de reação foi transferida para

um tubo Eppendorf de 2 mL, o frasco de reação foi lavado duas vezes com 600 µL de DMSO-EtOH (1:1) e as porções combinadas foram centrifugadas. O sólido foi separado do sobrenadante. O produto foi precipitado pela adição de 45 µL de MTBE ao sobrenadante. A suspensão branca foi centrifugada e o sobrenadante resultante foi descartado. A purificação do composto alvo foi realizada em um Sistema Isolera One (Biotage AB, Upsala, Suécia) equipado com um cartucho esférico AQ C18 de 20-35 um 100A 40 gr executando um gradiente de 2% a 50% de água/acetonitrila. Após liofilização, o composto do título foi obtido como um sólido esbranquiçado. Rendimento de 80 mg, 40%. HPLC (método 10, 220 nm)> 97%. Análise de NMR e LC-MS de acordo com o relatado anteriormente.

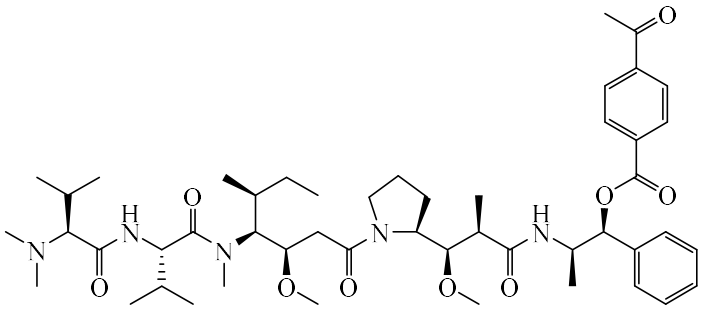
Exemplo 3

[0183] Composto AE-Éster-Sulf07, 2-(2-(1-(4-(((1S,2R)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4R,5S)-4-((S)-2-((R)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metil-heptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-1-fenilpropoxi)carbonil)fenil)etilideno)hidrazina-1-carbonil)-5-(6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)benzenossulfônico foi sintetizado como descrito abaixo e mostrado no esquema 6.



Esquema 6

Síntese de (1S, 2R)-2-((3R)-3-((S)-1-((3R, 4S, 5R)-4-((S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metil-heptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-1-fenilpropil 4-acetilbenzoato (AE-Éster)

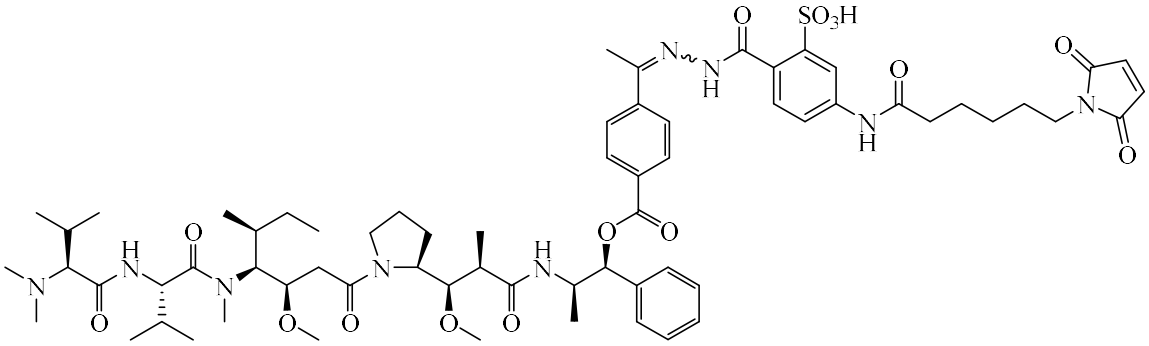


Síntese de acordo com um procedimento aprimorado da patente US6884869-B2

[0184] A uma solução de sal auristatina E TFA (1,0 g, 1,18 mmol, 1,0 equiv., Levena Biopharma) e ácido 4-acetilbenzoico (198 mg, 1,42 mmol, 1,2 equiv., Acros Organics) em diclorometano anidro (18 mL) na presença de peneiras moleculares (esferas de 0,3 nm, 3 Å) foram adicionadas 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 244 mg, 2,36 mmol, 2,0 equiv., Carbolution) e *N,N'*-di-isopropilcarbodiimida (DIC, 186 µL, 1,42 mmol, 1,2 equiv., Sigma Aldrich). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 5 h. O progresso da reação foi monitorado por HPLC (método 2, 220 nm), mostrando a conversão para o produto desejado de 81%. Adicionou-se DIC (155 µL, 1,18 mmol, 1,0 equiv., Sigma Aldrich) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 18 h, após o que a HPLC mostrou 98% de conversão da reação no produto desejado. Durante a síntese de diferentes lotes do composto, observou-se que, quando é utilizado DIC fresco de uma garrafa recém-aberta, não há necessidade da segunda adição. As peneiras moleculares e o precipitado formado fino, um subproduto do DIC, foram filtrados através de papel de filtro dobrado (grau 3 hw, Sartorius), e a solução amarela clara resultante foi lavada uma vez com HCl (0,1 M, 15 mL). A camada aquosa foi extraída de novo uma vez com diclorometano (15 mL), a camada orgânica foi então combinada, lavada uma vez com salmoura (15 mL) e seca sobre sulfato de sódio. A solução foi concentrada sob pressão reduzida a 40°C para dar um óleo amarelo, o qual foi então dissolvido em uma quantidade mínima de diclorometano (5 mL). Foi adicionado excesso de éter dietílico (50 mL) para produzir um sólido

branco. A mistura foi deixada a 2-4 °C durante 30 min e depois o sólido foi separado por centrifugação. O procedimento de precipitação foi repetido três vezes e o pó branco foi seco sob pressão reduzida. Rendimento: 706 mg, 68% de rendimento. Pureza por HPLC (método 2, 220 nm) 98%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado. Para $C_{49}H_{75}FN_5O_9$ $[M+H]^+$: 879,20. Encontrado: 878,70.

Síntese de 2-(2-(1-(4-(((1S,2R)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4R,5S)-4-((S)-2-((R)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metil-heptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-1-fenilpropoxi)carbonil)fenil)etilideno)hidrazina-1-carbonil)-5-(6-(*2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il*)hexanamido)benzenossulfônico (AE-Éster-Sulf07)



[0185] Uma solução de Sulf07 (164 mg, 0,31 mmol, 1,1 equiv.) em dimetilsulfóxido anidro (2 mL) foi adicionada a uma solução de AE-Éster (243 mg, 0,28 mmol, 1,0 equiv.) em etanol anidro (8 mL) na presença de peneiras moleculares (esferas de 0,3 nm, 3Å). Ácido *para*-toluenossulfônico (10,5 mg, 0,05 mmol, 0,2 equiv.) foi adicionado para catalisar a reação, e a reação foi então agitada à temperatura ambiente. O TFA também pode ser usado em vez do ácido para-toluenossulfônico. A reação foi monitorada por HPLC (método 2, 220 nm), mostrando a conversão completa após 15 h. As peneiras moleculares e o precipitado fino formado foram removidos da solução de reação por filtração através de papel de filtro dobrado (grau 3 hw, Sartorius). A solução foi precipitada com uma quantidade excessiva de metil *terc*-butílico (60 mL) e a mistura foi deixada a 2-4 °C por 30 min. O precipitado foi então separado por centrifugação para obter um sólido pegajoso amarelo. O sólido

pegajoso amarelo foi dissolvido em metanol/diclorometano 3/7 (10 mL) e a solução foi injetada em um sistema de purificação instantânea, com um cartucho SNAP Ultra 25 g pré-embalado. A purificação foi realizada na fase normal usando um gradiente de etapa, de 100% de diclorometano a 60% de diclorometano/40% de metanol em 17 volumes de coluna. Os tubos contendo o produto foram combinados e secos sob alto vácuo. Rendimento: 162 mg, 45% de rendimento. Pureza por RP-HPLC (método 2, 220 nm) 96%. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para $C_{66}H_{93}N_9O_{15}S$ $[M+H]^+$: 1285,58. Encontrado: 1284,20. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.24 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 10,21 (s, 1H), 9,20 (2 x br.s, 1H), 8,32 - 7,90 (m, 8H), 7,74 - 7,71 (dd, *J* = 8,5, 2,7 Hz, 1H), 7,41 - 7,27 (m, 5H), 7,00 (s, 2H), 6,13 - 6,02 (2 x d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 4,80 - 4,51 (m, 2H), 4,41 - 4,23 (m, 1H), 4,09-3,55 (m, 3H), 3,54-3,37 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H), 3,27 - 3,17 (m, 8H), 3,00 (s, 2H), 2,88 - 2,63 (m, 5H), 2,37 - 2,30 (m, 6H), 2,22 - 1,80 (m, 4H), 1,75 - 1,48 (m, 7H), 1,42 - 1,22 (m, 6H), 1,18 - 1,11 (m, 3H), 1,10 - 1,04 (m, 3H), 1,00 - 0,74 (m, 20H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 172,93, 172,65, 171,44, 170,94, 168,61, 168,49, 164,59, 164,52, 164,24, 164,16, 149,20, 144,83, 143,05, 142,96, 140,71, 137,97, 137,78, 134,30, 132,25, 129,43, 129,38, 129,31, 129,21, 128,39, 128,31, 126,49, 126,44, 126,35, 125,72, 118,77, 116,77, 85,20, 81,26, 77,65, 77,04, 76,84, 60,82, 60,12, 58,59, 58,03, 57,01, 48,35, 47,76, 47,15, 46,03, 43,60, 42,99, 36,89, 36,11, 31,64, 29,89, 29,73, 27,70, 26,56, 25,70, 25,33, 25,04, 24,42, 24,04, 23,03, 19,16, 18,63, 18,44, 18,37, 15,50, 15,47, 15,29, 15,14, 13,88, 13,84, 10,19, 10,04. Nota: Alguns sinais de ^{1}H-NMR são divididos em dois sinais diferentes devido à presença de conformes na solução. Por esse motivo, o número de picos no espectro ^{13}C-NMR é maior que o número de carbonos esperado para AE-Éster-Sulf07.

Liberação dependente de pH dos conjugados de albumina sérica humana de AE-Ceto-Sulf07 e AE-Éster-Sulf07 a pH 7,4 e pH 4,1 (Figuras 11 e 12)

[0186] Os derivados de auristatina-Sulf07 de ligação à albumina foram preparados como soluções de estoque 2 mM em DMSO anidro.

[0187] Liberação a pH 7,4: 442,4 µL de 1000 µM de albumina sérica humana reduzida (881 µM de cisteína-34) e 727,6 µL de tampão PBS (fosfato de sódio 4 mM, pH 7,4 e NaCl 150 mM) foram adicionados a um frasco de HPLC vedado e incubados em 37°C por 30 minutos. Após 30 minutos de incubação, foram adicionados ao frasco pré-incubado 130 µL da solução de estoque apropriada da droga DMSO para produzir uma solução de 200 µM da droga auristatina e uma solução de 300 µM de albumina (cisteína-34 livre). A mistura foi deixada reagir por 10 minutos a 37°C e depois analisada por HPLC (método 7, injeção de 20 µL). As injeções foram repetidas após 1 hora e depois a cada hora até 24 horas.

[0188] Liberação a pH 4,1: 408,5 µL de 1000 µM de albumina sérica humana reduzida (881 µM de cisteína-34) e 539,4 µL de água foram adicionados a um frasco de HPLC vedado e incubados a 37°C por 30 minutos. Num frasco separado, 190 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 3,0 e 24,7 µL de HCl 1 M foram incubados a 37°C por 30 minutos. Após 30 minutos de incubação, foram adicionados 120 µL da solução de estoque apropriada de droga de DMSO ao frasco pré-incubado para produzir o conjugado de droga de albumina. Após 10 minutos de incubação, foram adicionados 132 µL da solução tampão de acetato de sódio para produzir uma solução de 200 µM de derivado de droga para auristatina e uma solução de 300 µM de albumina (cisteína-34 livre). A solução resultante foi analisada diretamente por HPLC (método 7). A injeção do frasco foi repetida após 1 hora e depois a cada hora até 24 horas.

[0189] A porcentagem de medicamento livre liberado foi determinada por HPLC com uma curva de calibração (200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM e 12,5 µM) para as drogas livres, isto é, AE-Ceto para AE-Ceto-Sulf07 e AE-Éster para AE-Éster-Sulf07. As soluções de estoque de drogas foram preparadas usando DMSO como solvente e diluídas 10 vezes com tampão fosfato (fosfato de sódio 4 mM, pH 7,4 e NaCl 150 mM) antes da análise por HPLC. Os cálculos de liberação de drogas foram

baseados em AUC: para AE-Ceto a 254 nm e AE-Éster a 310 nm (máximos locais de UV). A porcentagem de AE-Éster liberada foi superior à porcentagem de AE-Ceto liberada após a alteração da forma de pH 7,4 para 4,1 (compare as Figuras 11 e 12). Estabilidade de reconstituição AE-Ceto-Sulf07 e AE-Ceto-EMCH (Figura 1)

[0190] Os derivados do medicamento AE-Ceto de ligação à albumina foram reconstituídos em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,6, que continha sacarose a 5% (p/v) e 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina a 2% (2-HPβCD). Ambas as drogas foram reconstituídas a uma concentração de 1277 μM (igual a 4,5 mg/kg de dose de xenoenxerto murino), a dissolução de ambas as drogas foi confirmada por HPLC (método 2, 254 nm). A estabilidade das drogas reconstituídas foi monitorizada por HPLC à temperatura ambiente a cada 15 minutos durante um período de 240 minutos para hidrólise de maleimida e perda de API. O AE-Ceto-Sulf07 foi mais estável que o AE-Ceto-EMCH (veja a Figura 1).

Estabilidade de reconstituição AE-Éster-Sulf07 e AE-Éster-EMCH (Figura 2)

[0191] Os derivados do medicamento AE-Éster de ligação à albumina foram reconstituídos em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,6, que continha sacarose a 5% (p/v) e 4% de 2-HPβCD. Ambas as drogas foram reconstituídas a uma concentração de 655 μM (igual a 2,4 mg/kg de dose de xenoenxerto murino), a dissolução de ambas as drogas foi confirmada por HPLC (método 2, 310 nm). A estabilidade das drogas reconstituídas foi monitorizada por HPLC à temperatura ambiente a cada 15 minutos durante um período de 240 minutos para hidrólise de maleimida e perda de API. O AE-Éster-Sulf07 era mais estável que o AE-Éster-EMCH (veja a Figura 2).

Cinética de ligação dos derivados da auristatina-Sulf07 no plasma humano, plasma de rato e plasma murino CD1 (Figuras 5-10).

[0192] O plasma murino CD1 e o plasma de rato Sprague Dawley foram removidos do armazenamento a -80°C e deixados atingir à temperatura ambiente. O

plasma descongelado foi centrifugado a 13,6 kRPM por 60 segundos, o sobrenadante foi filtrado através de uma agulha de filtro (5 µm) e subsequentemente através de uma membrana CA de 0,45 µm.

[0193] O sangue total foi retirado de um voluntário humano saudável (tubo de coleta EDTA), o plasma foi separado dos glóbulos vermelhos por centrifugação por 3 minutos a 3000 RPM. O plasma foi então usado diretamente, dentro de 2 horas após a doação de sangue. Foram utilizados 360 µL do plasma apropriado para cada experiência de ligação.

[0194] Todas as experiências de ligação foram realizadas em triplicado. O plasma foi incubado a 37°C usando um Eppendorf Thermomixer C. Após 30 minutos de incubação, 40 µL do derivado auristatina-Sulf07 de ligação à albumina apropriado foram dissolvidos em sua solução de reconstituição e adicionados ao plasma. As amostras (40 µL) foram coletadas após 15 segundos, 2 minutos, 4 minutos, 8 minutos e 15 minutos (5 amostras).

[0195] As amostras foram imediatamente adicionadas a 160 µL de acetonitrila (contendo 4 µg/mL de 'MMAE como padrão interno) e submetidas a vórtice por 1 minuto.

[0196] As soluções foram pipetadas para uma placa de precipitação de plasma Impact (agitada por 60 segundos) e filtradas por vácuo em uma placa de 96 poços. A droga restante foi determinada por quantificação por LCMS (método 5, injeção de 30 µL) usando o modo negativo de MRM MS2 (monitoramento de reação múltipla). Íons parentais: auristatina F (Massa-744.8), AE-Ceto-Sulf07 (Massa-1135.1) e AE-Éster-Sulf07 (Massa-1283.2). A percentagem de ligação foi determinada comparando a AUC para AE-Ceto-Sulf07 e AE-Éster-Sulf07 com curvas de calibração geradas por LCMS para cada composto.

Procedimento: Especificidade de ligação dos derivados da auristatina-Sulf07 à cisteína-34 da albumina sérica humana (Figuras 3-4).

[0197] Os derivados de auristatina-Sulf07 de ligação à albumina foram reconstituídos em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,6 e sacarose a 5%, que continha 2-HPβCD. Utilizou-se 2% de concentração de HPβCD para reconstituir o AE-Ceto-Sulf07 e 4% para o AE-Éster-Sulf07, respectivamente. Ambas as drogas foram reconstituídas a uma concentração de 1 mg/mL (AE-Ester-Sulf07 780 µM, AE-Ceto-Sulf07 880 µM).

[0198] O plasma humano foi removido do armazenamento a -80°C e deixado atingir à temperatura ambiente. O plasma descongelado foi centrifugado a 13,6 kRPM por 60 segundos, o sobrenadante foi filtrado através de agulha de filtro (5 µm) e subsequentemente através de uma membrana CA de 0,45 µm. Foram utilizados 180 µL do plasma apropriado para cada experiência de ligação. O plasma foi incubado a 37°C usando um Eppendorf Thermomixer C. Após 30 minutos de incubação, 20 µL do derivado auristatina-Sulf07 de ligação à albumina apropriado foram adicionados. A droga de ligação à albumina foi deixada reagir no plasma por 5 minutos a 37°C. Após 5 minutos, a solução foi analisada diretamente por cromatografia de interação hidrofóbica por HPLC (HIC, método 6, 250 nm) para confirmar a conjugação específica de sítio com a albumina e a formação do conjugado de droga com albumina.

Degradação acelerada de formulações liofilizadas de auristatina: comparação da estabilidade de EMCH e Sulf07 (Figuras 24-25).

[0199] As APIs foram dissolvidas no tampão de liofilização que continha 2-HPβCD, 10 mM de citrato de sódio, pH 6,2, 50% de álcool terc-butílico (V/V)). Para os derivados de AE-Ceto, empregou-se 2-HPβCD a 2% (p/v) para dissolver as APIs de AE-Ceto a uma concentração de 1,27 mM; para os derivados AE-Éster, foi utilizado 2-HPβCD a 4% (p/v) para dissolver as APIs na concentração de 1,05 mM. As APIs dissolvidas foram esterilizadas por filtração usando um filtro de seringa Acrodisc Fluorodyne II (0,2 µm). As soluções estéreis foram pipetadas em frascos de liofilização que foram então parcialmente vedados usando uma rolha de borracha. Os frascos

foram subsequentemente colocados no liofilizador para liofilização. Os frascos foram congelados na prateleira do liofilizador a -40°C por 2 horas, após 2 horas iniciada a secagem principal. A secagem principal foi realizada durante 26 horas, parâmetros: temperatura da prateleira -20°C, vácuo 0,0048 mbar. Após a secagem principal, foi iniciada a secagem final. A secagem final foi realizada durante 16 horas, parâmetros: temperatura da prateleira 20°C, vácuo 0,0047 mbar. Após a conclusão da secagem final, os frascos foram vedados sob vácuo.

[0200] Os frascos vedados foram incubados a 55°C usando um Eppendorf Thermomixer C com uma inserção de placa (Smartblock) e tampa. Nos momentos escolhidos (t: 0, 46, 94, 166 e 264 horas), as amostras foram removidas e dissolvidas em DMSO anidro. A estabilidade das APIs foi determinada por HPLC (método 8, 254 nm para derivados de AE-Ceto, 310 nm para derivados de AE-Éster). A porcentagem de hidrólise da maleimida em cada momento foi determinada por comparação com a AUC de cada API no tempo 0. AE-Ceto-Sulf07 e AE-Éster-Sulf07 foram mais estáveis que os respectivos derivados EMCH AE-Ceto-EMCH e AE-Éster-EMCH (ver Figura 24 e Figura 25).

Exemplo 4

Procedimento geral para a avaliação da auristatina E, AE-Keto e AE-Ester contra um painel de linhagens de células tumorais

Determinação de IC_{50}

[0201] As amostras foram fornecidas à Charles River Discovery Research Services Germany GmbH como soluções de estoque congeladas em DMSO de grau farmacêutico (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). Em cada dia do experimento, uma alíquota congelada de solução de estoque foi descongelada. As diluições em série subsequentes foram realizadas com meio de cultura de células RPMI 1640 completo usando uma placa de diluição intermediária. Transferiram-se 10 µL da placa de diluição intermediária para 140 µL/poço da placa de cultura de células. As células

foram tratadas com os compostos de teste em 10 concentrações em triplicado em etapas de meio log de 0,003 nM a 100 nM por um período de 96 h.

[0202] Os compostos foram testados em um painel de 6 linhagens celulares de câncer humano selecionadas, utilizando o ensaio CellTiter-Blue® Cell Viability (Promega, Mannheim, Alemanha). Os valores de IC são relatados como valores absolutos de IC_{50} , obtidos para um composto de teste como a média geométrica dos valores de IC_{50} em todas as linhagens celulares testadas.

[0203] As linhagens celulares utilizadas foram LXFL 1674L (estabelecida a partir de xenoenxerto derivado de paciente na Charles River Discovery Research Services Germany GmbH), SW-620 (gentilmente fornecida pela NCI, Bethesda, MD, EUA), CAL-27 (comprada da DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemanha), RKO, MDA-MB-468 e SK-OV-3 (de ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA). A autenticidade de todas as linhagens celulares foi comprovada no DSMZ por análise STR (repetição curta em tandem), uma metodologia de impressão digital de DNA baseada em PCR. As linhagens celulares eram rotineiramente passadas uma ou duas vezes por semana e mantidas em cultura por até 20 passagens. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 em meio RPMI 1640 (HEPES 25 mM, com L-glutamina, Biochrom, Berlim, Alemanha) suplementada com 10% (v/v) de soro fetal de bezerro (Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Alemanha) e 0,1 mg/mL de gentamicina (Life Technologies, Karlsruhe, Alemanha). O Ensaio de Viabilidade Celular CellTiter-Blue® foi usado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram colhidas a partir de culturas de fase exponencial, contadas e plaqueadas em placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano a uma densidade celular de 4.000-10.000 células/poço, dependendo da taxa de crescimento da linhagem celular. Após um período de recuperação de 24 h para permitir que as células retomassem o crescimento exponencial, foram adicionados 10 µL de meio de cultura (seis poços de

controle/placa) ou de meio de cultura com composto de teste. Os compostos foram aplicados em 10 concentrações em triplicado em incrementos de meio log até 100 nM e as células foram tratadas continuamente por 96 h. Após quatro dias de tratamento das células, foram adicionados 20 µL/poço de reagente CellTiter-Blue®. Após um período de incubação de até 4 h, a fluorescência (FU) foi medida usando o Leitor de Placas Enspire Multimode (excitação λ = 531 nm, emissão λ = 615 nm). Os valores de IC_{50} foram determinados com o software bioanalítico GraphPad Prism (San Diego, CA, USA).

[0204] Atividades dependentes da concentração com curvas sigmoidais de efeito-concentração foram observadas nas seis linhagens celulares tumorais testadas. Os valores de IC_{50} médios geométricos 259 ± 0,11 pM para AE-Ceto e 399 ± 0,19 pM para AE-Éster. Comparados às drogas altamente potentes MMAE (171 ± 0,10 pM) e AE (130 ± 0,05 pM), os derivados de AE-Ceto e AE-Éster têm citotoxicidade semelhante na faixa picomolar.

Exemplo 5

Procedimento geral para a avaliação da auristatina E e dos derivados da auristatina E de ligação à albumina em modelos de xenoenxertos de tumores derivados de pacientes.

[0205] Camundongos fêmeas NMRI imunodeficientes, da Charles River Discovery Research Services Germany GmbH, receberam implantes de tumor unilaterais por via subcutânea no flanco esquerdo enquanto sob anestesia com isoflurano com tumores de origem humana, até que os tumores fossem palpáveis e atingissem o volume desejado.

[0206] Os animais foram mantidos em gaiolas, a temperatura dentro das gaiolas foi mantida a 25 ± 1°C com uma umidade relativa de 45 - 65% e uma taxa de troca de ar de 60 vezes por hora. Os camundongos foram mantidos sob um ciclo de luz artificial de 14 horas luz/10 horas escuro. Os animais foram alimentados com

Teklad Global 19% Protein Extruded Diet autoclavado (T.2019S.12) da Envigo RMS SARL e tiveram acesso à água da torneira esterilizada, filtrada e acidificada (pH 2,5), que foi trocada duas vezes por semana. Ração e água foram fornecidos *ad libitum*. Antes da terapia, os animais foram randomizados (7-8 camundongos por grupo) considerando uma mediana e média comparáveis do volume do tumor do grupo. Os animais foram monitorados rotineiramente duas vezes por dia em dias úteis e diariamente aos sábados e domingos. A partir do dia 0, os animais foram pesados duas vezes por semana. Os pesos corporais relativos (RBW) de animais individuais foram calculados dividindo-se o peso corporal absoluto individual no dia X (BW_x) pelo peso corporal individual no dia da randomização multiplicado por 100%. O volume do tumor foi determinado por uma medida bidimensional com pinças no dia da randomização (dia 0) e depois duas vezes por semana. Os volumes tumorais foram calculados de acordo com a seguinte equação:

Tumor Vol [mm^3] = l [mm] x w^2 [mm^2] x 0,5, onde "l" é o comprimento e "w" é a largura do tumor. O volume relativo de um tumor individual no dia X (RTV_x) foi calculado dividindo o volume absoluto do tumor individual [mm^3] do respectivo tumor no dia X (Tx) pelo volume absoluto do tumor individual do mesmo tumor no dia da randomização multiplicado por 100%. Os cronogramas foram aplicados na extensão permitida pelas políticas de bem-estar animal. A terminação de camundongos individuais foi realizada com volume de tumor > 2000 mm^3 (unilateral). Para a avaliação da significância estatística da eficácia antitumoral, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do método de Dunn para comparações pareadas, em que os RTVs individuais dos grupos de teste e controle foram comparados nos dias em que os valores mínimos de T/C foram alcançados nos grupos de teste, onde T/C [%] = (grupo tratado com RTV_x mediano /grupo de controle RTV_x mediano) x 100. A análise estatística foi realizada apenas se pelo menos 50% dos animais inicialmente randomizados em um grupo relevante ainda estavam vivos. As

comparações entre os grupos de teste foram realizadas nos mesmos dias. Por convenção, valores de p ≤0,05 indicam significância da inibição do tumor. Os cálculos estatísticos foram realizados usando o software bioanalítico GraphPad Prism (San Diego California EUA, www.graphpad.com).

Procedimento geral para a avaliação da auristatina E e dos derivados da auristatina E de ligação à albumina em modelos de xenoenxertos de tumores derivados de estudos de achados de dose e linhagem celular.

[0207] Camundongos nus fêmeas NMRI imunodeficientes, de Janvier, França, receberam $5x10^6$-10^7 células cancerígenas cultivadas em tampão/Matrigel (1:1) inoculadas por via subcutânea, até os tumores serem palpáveis e atingirem o volume desejado (para estudos com xenoenxerto).

[0208] Os animais foram mantidos em gaiolas (tela metálica Macrolon Tipo II) com temperatura mantida a 22 ± 1°C, umidade relativa de 50 ± 10% e taxa de troca de ar de 60 vezes por hora. Os camundongos foram mantidos sob um ciclo de luz artificial de 12 horas luz/12 horas escuro. Os animais foram alimentados com Ssniff NM autoclavado (Soest, Alemanha) e tiveram acesso a água da torneira estéril, filtrada e acidificada (pH 4,0), que foi trocada duas vezes por semana. Ração e água foram fornecidos *ad libitum*. Antes da terapia, os animais foram randomizados (3-4 camundongos por grupo em estudos de determinação de dose e 7-8 camundongos por grupo em estudos de xenoenxerto) considerando uma mediana e média comparáveis do volume do tumor do grupo. A saúde dos animais foi examinada no início do experimento e duas vezes por dia durante o experimento. Identificação utilizada: marca auricular e rótulos de gaiola. A partir do dia 0, os animais foram pesados duas ou três vezes por semana e o peso corporal médio por grupo foi relacionado ao valor inicial em porcentagem para calcular a alteração do peso corporal (BWC). Os diâmetros do tumor foram determinados por uma medida bidimensional com um paquímetro no dia da randomização (dia 0) e depois duas ou três vezes por

semana. Os volumes tumorais foram calculados de acordo com a seguinte equação:

Tumor Vol [mm^3] = l [mm] x w^2 [mm^2] x 0,5, onde "l" é o comprimento e "w" é a largura do tumor. O volume relativo de um tumor individual no dia X (RTV_x) foi calculado dividindo o volume absoluto do tumor individual [mm^3] do respectivo tumor no dia X (Tx) pelo volume absoluto do tumor individual do mesmo tumor no dia da randomização multiplicado por 100%. Os cronogramas foram aplicados na extensão permitida pelas políticas de bem-estar animal. A terminação de camundongos individuais foi realizada com volume tumoral > 1500 mm^3 (unilateral) ou quando foi observada ulceração. A comparação estatística foi realizada com o teste U de Mann-Whitney.

Estudos de localização de doses da auristatina E e dos derivados da auristatina E de ligação à albumina AE-Ceto-Sulf07 e AE-Éster-Sulf07.

[0209] As soluções de estoque foram preparadas da seguinte forma:

1) 3 camundongos por grupo, 26 g de peso médio no dia da randomização: 0,3 a 0,6 ou 1,2 mg/kg de sal de auristatina E TFA (AE equiv.) doseado uma vez por semana durante 4 semanas no dia 0, 6, 13, 20 ≡ 0,35-1,41 mg/kg ≡ 7,1-28,3 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 8,5 mg pesados em um frasco de 50 mL dissolvido em 30,0 mL de 25/75 *terc*-butanol/fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 0,2-0,8 mL foram aliquotados em frascos de 2 mL, dependendo da dose final desejada final. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 0,8 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, 20% de propilenoglicol - pH 7,0.

2) 3 camundongos por grupo, 26 g de peso médio no dia da randomização: 1,2 e 2,4 mg/kg de AE-Ceto-Sulf07 (AE equiv.) Administrados duas vezes por semana durante 4 semanas ≡ 1,94-3,87 mg/kg ≡ 38,7 e 77,4 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 11,0 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvido em 14,2

mL de 50/50 *terc*-butanol/fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 0,4-0,8 mL foram aliquotados em frascos de 2 mL, dependendo da dose final desejada final. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 0,8 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, 20% de propilenoglicol - pH 7,0.

3) 3 camundongos por grupo, 26 g de peso médio no dia da randomização: 1,2, 1,6 ou 2,0 mg/kg de AE-Éster-Sulf07 (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas no dia (2,18-3,64 mg/kg) 43,7-72,8 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 19,2 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvido em 26,3 mL de 50/50 *terc*-butanol/fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 0,48-0,8 mL foram aliquotados em frascos de 2 mL, dependendo da dose final desejada final. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 0,8 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, Tween 80 a 5% - pH 7,6.

4) 4 camundongos por grupo, 23 g de peso médio no dia da randomização: 2,0, 2,2 e 2,4 mg/kg AE-Éster-Sulf07 (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas no dia (3,64-4,37 mg/kg) 72,8-87,3 μg/20 g de camundongo e 4,0, 4,4 e 4,8 mg/kg de AE-Éster-Sulf07 (AE equiv.) doseados uma vez por semana durante 4 semanas no dia 0, 7, 14, 21 ≡ 7,28-8,73 mg/kg ≡ 145,6-174,7 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 56,0 mg pesados em um frasco de 50 mL dissolvido em 32,0 mL de 50/50 *terc*-butanol/fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 0,33-0,8 mL foram aliquotados em frascos de 2 mL, dependendo da dose final desejada final. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 0,8 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, Tween 80 a 2% - pH 7,6.

[0210] As doses de 1,2 e 0,6 mg/kg de auristatina E mostraram alta toxicidade e nenhum animal sobreviveu após a primeira e a segunda injeção, respectivamente. A dose de 0,3 mg/kg foi bem tolerada. Em estudos posteriores, verificou-se que AE era tolerado a 0,3 mg/kg injetado quinzenalmente por quatro semanas (total de oito injeções) e, portanto, essa dose foi usada em estudos com xenoenxerto como a dose máxima tolerada (MTD).

[0211] Todas as doses testadas para AE-Ceto-Sulf07 injetadas oito vezes em um esquema quinzenal foram bem toleradas. Em estudos posteriores com xenoenxerto, a dose deste medicamento foi aumentada para 6,5 mg/kg no mesmo regime de dosagem, provocando a maior dose de perda de peso corporal em um camundongo e problemas de saúde geral em um segundo camundongo, e o tratamento teve que ser interrompido após cinco injeções em vez de oito conforme planejado. Portanto, essa dose foi considerada acima da MTD e 4,5 mg/kg foi selecionado como dose segura.

O AE-Éster-Sulf07 foi inicialmente testado até 2,0 mg/kg, administrado duas vezes por semana, durante quatro semanas, sem sinais evidentes de toxicidade. Como a irritação da pele foi mais tarde observada nos estudos de xenoenxerto, um segundo estudo de descoberta de doses foi repetido em 2,0, 2,2 e 2,4 mg/kg, administrado duas vezes por semana durante quatro semanas e comparado com as respectivas doses dobradas de 4,0, 4,4 e 4,8 mg/kg injetados apenas uma vez por semana. Não foi observada alteração no peso corporal, mas a irritação da pele apareceu após 9 a 14 dias em todos os grupos. Irritação da pele mais precoce e frequente foi observada para doses mais altas. O efeito colateral parecia ser reversível quando as irritações começaram a curar após o término do tratamento. O grupo tratado com 4,0 mg/kg uma vez por semana apresentou o menor efeito colateral, enquanto nenhuma diferença significativa foi observada entre os outros grupos.

Critérios de avaliação para auristatina E e derivados da auristatina E de

ligação à albumina em modelos de xenoenxerto tumoral

[0212] A eficácia de cada medicamento foi determinada com base na redução do volume do tumor (% do volume do tumor no dia selecionado em comparação ao dia 0): remissão completa < 10%; remissão parcial > 10-50%; remissão menor > 50-75%; doença estável > 75-125%; doença progressiva > 125% em relação ao volume inicial do tumor.

Avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Ceto-Sulf07 em um modelo de câncer de melanoma maligno humano A375 - tumores pequenos (Figura 13).

[0213] A avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Ceto-Sulf07 em um modelo de câncer de melanoma maligno humano A375 foi realizada conforme descrito no procedimento geral para modelos de xenoenxerto derivados de linhagem celular.

[0214] As soluções de estoque foram preparadas da seguinte forma:

1) 7 camundongos, 29 g de peso médio, 135 mm^3 volume mediano médio do tumor no dia da randomização: 0,3 mg/kg de sal de auristatina E TFA (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 3 semanas no dia 0, 6, 9, 13, 16, 19 ≡ 0,35 mg/kg ≡ μ7,1 g/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 2 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 28,3 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, 20% de propilenoglicol - pH 7,0.

2) 7 camundongos, 28 g de peso médio, 137 mm^3 volume médio mediano de tumor no dia da randomização: 3,0 mg/kg AE-Ceto-Sulf07 (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 3 semanas no dia 0, 6, 9, 13 , 16, 19 ≡ 5,32 mg/kg ≡ 106,3 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 19,2 mg pesados em um frasco de

30 mL dissolvido em 19,0 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, 20% de propilenoglicol - pH 7,0.

[0215] O desenvolvimento do crescimento tumoral no modelo de xenoenxerto de melanoma A 375 mostrou eficácia antitumoral estatisticamente significativa do composto AE-Ceto-Sulf07 a 3,0 mg/kg versus dose de auristatina E 0,3 mg/kg, ambos injetados seis vezes duas vezes por semana ($p < 0,01$ do dia 27 ao dia 37). Os camundongos tratados com auristatina E atingiram um estado de doença estável até o dia 21, após o qual o tumor começou a crescer novamente. Em contraste, os ratos do grupo tratado com AE-Ceto-Sulf07 alcançaram regressão tumoral a longo prazo, mostrando remissão completa do dia 19 até o final do estudo no dia 37 (1 mm^3 de volume do tumor final).

[0216] Os ratos do grupo tratado com AE-Ceto-Sulf07 tiveram apenas uma ligeira redução no crescimento do peso corporal em comparação com o controle, mas não foram observados efeitos colaterais detectáveis.

Avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Ceto-Sulf07 em um modelo de câncer de melanoma maligno humano A375 - tumores grandes (Figura 14).

[0217] A avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Ceto-Sulf07 em um modelo de câncer de melanoma maligno humano A375 foi realizada conforme descrito no procedimento geral para modelos de xenoenxerto derivados de linhagem celular.

[0218] As soluções de estoque foram preparadas da seguinte forma:

1) 7 camundongos, 28 g de peso médio, 310 mm^3 volume mediano médio do tumor no dia da randomização: 0,3 mg/kg de sal de auristatina E TFA (AE equiv.)

doseados duas vezes por semana durante 3 semanas no dia 1, 6, 9, 13, 16 ≡ 0,35 mg/kg ≡ 7,1 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 2 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 28,3 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, 20% de propilenoglicol - pH 7,0.

2) 7 camundongos, 27 g de peso médio, 331 mm^3 volume médio mediano de tumor no dia da randomização: 6,5 mg/kg AE-Ceto-Sulf07 (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 3 semanas no dia 1, 6, 9, 13, 16 ≡ 11,52 mg/kg ≡ 230,4 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 28,0 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 12,23 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, Tween 80 a 2% - pH 7,6.

[0219] A eficácia antitumoral do composto AE-Ceto-Sulf07 também foi testada em camundongos portadores de tumores A375 de melanoma maligno maiores (~ 320 mm^3), para provar que a eficácia do medicamento não se limita a tumores pequenos. Os camundongos tratados com AE-Ceto-Sulf07 a 6,5 mg/kg mostraram uma melhora estatisticamente significativa no efeito antitumoral em comparação ao grupo tratado com auristatina E na dose de 0,3 mg/kg, ambos injetados cinco vezes duas vezes por semana ($p < 0,01$ do dia 9 até o dia 33). A auristatina E mostrou doença inicial estável até o dia 14 e depois cresceu de forma constante, enquanto os ratos do grupo tratado com AE-Ceto-Sulf07 registraram uma remissão completa do dia 19 até o final do estudo no dia 37, atingindo o volume tumoral mínimo de 1 mm^3 no dia 28 (12 dias após o último tratamento) e ~14 mm^3 no final do estudo, resultando em um efeito a

longo prazo, apesar do grande volume mediano inicial relativo do tumor.

[0220] O AE-Ceto-Sulf07 causou uma perda transitória de peso corporal (13% atingida no dia 21) e dois ratos foram sacrificados por más condições gerais.

Avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Keto-Sulf07 em um modelo humano de câncer de pulmão de células não pequenas, LXFA737 - tumores pequenos (Figura 15).

[0221] A avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Ceto-Sulf07 em um modelo de câncer de pulmão de células não pequenas humanas LXFA737 foi realizado como descrito no procedimento geral para modelos de xenoenxerto derivados de paciente

[0222] As soluções de estoque foram preparadas da seguinte forma:

1) 7 camundongos, 27 g de peso médio, 137 mm^3 volume mediano médio do tumor no dia da randomização: 0,3 mg/kg de sal de auristatina E TFA (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas no dia 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 ≡ 0,35 mg/kg ≡ 7,1 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 2 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 28,3 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, 20% de propilenoglicol - pH 7,0.

2) 7 camundongos, 26 g de peso médio, 128 mm^3 de volume médio mediano de tumor no dia da randomização: 4,5 mg/kg AE-Ceto-Sulf07 (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas no dia 0, 4, 7, 11 , 14, 18, 21, 25 ≡ 7,98 mg/kg ≡ 159,5 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 38 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 23,8 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois

tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, 2% de 2-hidroxipropil-ß-ciclodextrina 2-HPßCD - pH 7,6.

3) 7 camundongos, 27 g de peso médio, 130 mm^3 de volume médio mediano de tumor no dia da randomização: 4,5 mg/kg AE-Ceto-Sulf07 (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas no dia 0, 4, 7, 11 , 14, 18, 21, 25 ≡ 7,98 mg/kg ≡ 159,5 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 38 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 23,8 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão de citrato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 6.; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, Tween 80 a 2% - pH 7,6.

[0223] O desenvolvimento do crescimento tumoral no modelo de xenoenxerto NSCLC LXFE737 mostrou eficácia antitumoral superior do composto AE-Ceto-Sulf07 a 4,5 mg/kg (ambos nos tampões Tween 80 e 2-HPßCD) versus auristatina E a 0,3 mg/kg doseado 8 vezes duas vezes por semana com significância estatística ($p < 0,01$ nos dias 56 e 63). Os tumores no grupo tratado com auristatina E permaneceram apenas temporariamente em um estado estável da doença (do dia 21 ao dia 42) e cresceram significativamente após o final da terapia. Por outro lado, camundongos tratados com AE-Ceto-Sulf07 alcançaram remissão completa do tumor no dia 28, 3 dias após o término da terapia, diminuindo o volume do tumor para um nível incomensurável até o final do estudo no dia 74 (independentemente do tampão utilizado), resultando em um efeito antitumoral a longo prazo.

[0224] A alteração do peso corporal em relação ao controle mostrou um aumento parcial da toxicidade no grupo tratado com AE-Ceto-Sulf07. No dia 32, foi registrada uma perda máxima de peso corporal (-7%) sem outros sinais de toxicidade no caso de 2-HPßCD, enquanto dois ratos foram sacrificados por más condições

gerais quando o medicamento foi administrado no Tween 80.

Avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Keto-Sulf07 em um modelo humano de câncer de pulmão de células não pequenas, LXFA737 - tumores grandes (Figura 16).

[0225] A avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Ceto-Sulf07 em um modelo de câncer de pulmão de células não pequenas humanas LXFA737 foi realizado como descrito no procedimento geral para modelos de xenoenxerto derivados de paciente

[0226] As soluções de estoque foram preparadas da seguinte forma:

1) 8 camundongos, 26 g de peso médio, 324 mm^3 volume mediano médio do tumor no dia da randomização: 0,3 mg/kg de sal de auristatina E TFA (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas no dia 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26 ≡ 0,35 mg/kg ≡ 7,1 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 3 mg pesados em um frasco de 100 mL dissolvidos em 43,3 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 2,4 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 2,4 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, 20% de propilenoglicol - pH 7,0.

2) 8 camundongos, 28 g de peso médio, 342 mm^3 de volume médio mediano de tumor no dia da randomização: 4,5 mg/kg AE-Ceto-Sulf07 (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas nos dias 1, 5, 8, 12 , 15, 19, 22, 26 × 6,99 mg/kg × 139,7 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 51 mg pesados em um frasco de 100 mL dissolvido em 36,5 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão de citrato de sódio 10 mM, 3% de 2-HPßCD - pH 6,2; 2,4 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 2,4 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, sacarose 5% - pH 7,6.

[0227] O desenvolvimento do crescimento tumoral no modelo de xenoenxerto NSCLC LXFE737 mostrou eficácia antitumoral superior do composto AE-Ceto-Sulf07 a 4,5 mg/kg versus auristatina E a 0,3 mg/kg, ambos doseados 8 vezes duas vezes por semana com significância estatística ($p < 0,01$ no dia 28). Os tumores no grupo tratado com auristatina E não mostraram atividade, enquanto os camundongos tratados com AE-Ceto-Sulf07 atingiram remissão parcial do tumor no dia 15 até o final do estudo no dia 59, resultando em um efeito antitumoral a longo prazo.

[0228] Nenhum efeito colateral foi registrado.

Avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Ceto-Sulf07 em um carcinoma ovariano humano modelo A2780 - tumores pequenos (Figura 17).

[0229] A avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Ceto-Sulf07 em um carcinoma ovariano humano modelo A2780 foi realizada conforme descrito no procedimento geral para modelos de xenoenxerto derivados de linhagem celular.

[0230] As soluções de estoque foram preparadas da seguinte forma:

1) 7 camundongos, 27 g de peso médio, 147 mm^3 volume mediano médio do tumor no dia da randomização: 0,3 mg/kg de sal de auristatina E TFA (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas no dia 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 ≡ 0,35 mg/kg ≡ 7,1 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 2 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 28,3 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, 20% de propilenoglicol - pH 7,0.

2) 7 camundongos, 27 g de peso médio, 153 mm^3 volume médio mediano de tumor no dia da randomização: 3,0 mg/kg AE-Ceto-Sulf07 (AE equiv.) doseados duas

vezes por semana durante 4 semanas no dia 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 ≡ 5,32 mg/kg ≡ 106,3 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 51,0 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 28,8 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 0,72 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, Tween 80 a 2% - pH 7,6.

3) 7 camundongos, 25 g de peso médio, 141 mm^3 volume médio mediano de tumor no dia da randomização: 5,0 mg/kg AE-Ceto-Sulf07 (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas no dia 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 ≡ 8,86 mg/kg ≡ 177,2 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 51,0 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 28,8 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, Tween 80 a 2% - pH 7,6.

[0231] O desenvolvimento do crescimento tumoral no modelo de carcinoma ovariano A2780 mostrou eficácia antitumoral superior estatisticamente significativa do composto AE-Ceto-Sulf07 a 3,0 e 5,0 mg/kg versus auristatina E na dose de 0,3 mg/kg, injetada oito vezes duas vezes por semana ($p < 0,01$ do dia 7 ao dia 29). Os camundongos tratados com auristatina E não obtiveram nenhum efeito antitumoral, e os tumores cresceram comparativamente aos tratados com o grupo controle. No entanto, a terapia com AE-Ceto-Sulf07 induziu remissão parcial do dia 9 até o final do estudo no dia 60, com uma remissão completa transitória do dia 23 ao dia 35 para a dose mais baixa e do dia 25 ao dia 51 para a dose mais alta, resultando em regressão tumoral a longo prazo, independentemente da dose.

[0232] Os grupos tratados com AE-Ceto-Sulf07 causaram uma perda

transitória de peso corporal de ~ 2% após o primeiro tratamento. Um camundongo do grupo de doses mais altas foi encontrado morto no dia 35 e um do grupo de doses mais baixas teve que ser sacrificado no dia 42 por más condições gerais.

Avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Ceto-Sulf07 em um carcinoma ovariano humano modelo A2780 - tumores grandes (Figura 18).

[0233] A avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Ceto-Sulf07 em um carcinoma ovariano humano modelo A2780 foi realizada conforme descrito no procedimento geral para modelos de xenoenxerto derivados de linhagem celular.

[0234] As soluções de estoque foram preparadas da seguinte forma:

1) 8 camundongos, 28 g de peso médio, 341 mm^3 volume mediano médio do tumor no dia da randomização: 0,3 mg/kg de sal de auristatina E TFA (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas no dia 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 ≡ 0,35 mg/kg ≡ 7,1 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 3,7 mg pesados em um frasco de 100 mL dissolvidos em 52,3 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,5 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, 20% de propilenoglicol - pH 7,0.

2) 8 camundongos, 28 g de peso médio, 378 mm^3 de volume médio mediano de tumor no dia da randomização: 4,5 mg/kg AE-Ceto-Sulf07 (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas nos dias 1, 4, 8, 11 , 15, 18, 22, 25 × 6,99 mg/kg × 139,7 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 40,0 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 28,6 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,5 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL.

Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, 2-HPßCD 2% - pH 7,6.

[0235] A eficácia antitumoral do composto AE-Ceto-Sulf07 também foi testada em camundongos portadores de tumores maiores (~ 360 mm^3) do carcinoma ovariano humano modelo A2780. A droga mostrou efeito antitumoral superior estatisticamente significante, dose de 4,5 mg/kg versus auristatina E, dose de 0,3 mg/kg, ambos injetados oito vezes duas vezes por semana ($p < 0,001$ do dia 22 ao dia 40). Os camundongos tratados com auristatina E não apresentaram efeito antitumoral, enquanto os camundongos tratados com AE-Ceto-Sulf07 apresentaram remissão completa do dia 26 até o final do estudo no dia 103, atingindo uma regressão tumoral a longo prazo, como já observado com menor tumores.

[0236] Os camundongos tratados com AE-Ceto-Sulf07 tiveram apenas um crescimento de peso corporal ligeiramente reduzido em comparação com o controle.

Avaliação inicial da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Éster-Sulf07 em um modelo de câncer de células renais humanas RXF631 - tumores pequenos (Figura 19).

[0237] A avaliação inicial da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Éster-Sulf07 em um modelo de câncer de células renais humanas RXF631 foi realizada conforme descrito no procedimento geral para um modelo de xenoenxerto derivado do paciente.

[0238] Para este experimento in vivo, as soluções de estoque foram preparadas da seguinte forma:

1) 7 camundongos, 25 g de peso médio, 138 mm^3 volume médio do tumor no dia da randomização: 0,3 mg/kg de sal de auristatina E TFA (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas no dia 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26 ≡ 0,35 mg/kg ≡ 7,1 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 2 mg pesados em um

frasco de 30 mL dissolvidos em 28,3 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a °-20 C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, 20% de propilenoglicol - pH 7,0.

2) 7 camundongos, 26 g de peso médio, 141 mm^3 de volume médio mediano de tumor no dia da randomização: 2,2-3,0 mg/kg AE-Éster-Sulf07 (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas no dia 1, 5, 8, 12, 15, 19, 26 ≡ 4,00 mg/kg ≡ 80,1 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 15,7 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvido em 19,6 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a °-20 C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, Tween 80 a 2% - pH 7,6.

[0239] O desenvolvimento do crescimento tumoral no modelo de câncer de células renais RXF631 mostra eficácia antitumoral superior estatisticamente significativa do composto AE-Éster-Sulf07 doseado a 2,2 mg/kg (a dose foi temporariamente aumentada para 3,0 mg/kg nos dias 15 e 19 da injeção) versus auristatina E doseada a 0,3 mg/kg, injetada oito e sete vezes, respectivamente, duas vezes por semana ($p < 0,05$). Auristatina E alcançou um status de doença estável até o dia ~ 40, para depois crescer de forma constante até o final do estudo. Por outro lado, a terapia com AE-Éster-Sulf07 causou remissão completa do dia 24 ao dia 53, atingindo um volume tumoral mínimo de 1 mm^3 e um efeito a longo prazo.

[0240] O AE-Éster-Sulf07 causou uma perda transitória de peso corporal com um mínimo de 9%, atingida no dia 31. Feridas por mordidas e arranhões também foram observados a partir do dia 17. Dois camundongos morreram e um tiveram que ser sacrificados por más condições gerais (nos dias 20, 43 e 66).

Avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Éster-Sulf07 em um modelo de câncer de melanoma maligno humano A375 - tumores grandes (Figura 20).

[0241] A avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Éster-Sulf07 em um modelo de câncer de melanoma maligno humano A375 foi realizada conforme descrito no procedimento geral para modelos de xenoenxerto derivados de linhagem celular.

[0242] Com base na experiência de dosagem no modelo de xenoenxerto RXF631, as soluções de estoque foram preparadas da seguinte maneira:

1) 7 camundongos, 28 g de peso médio, 310 mm^3 volume mediano médio do tumor no dia da randomização: 0,3 mg/kg de sal de auristatina E TFA (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 3 semanas no dia 1, 6, 9, 13, 16 ≡ 0,35 mg/kg ≡ 7,1 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 2 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 28,3 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, 20% de propilenoglicol - pH 7,0.

2) 7 ratos, 29 g de peso médio, 371 mm^3 volume mediano médio do tumor no dia da randomização: 2,4 mg/kg AE-Ester-Sulf07 (AE equiv.) administrado duas vezes por semana durante 3 semanas no dia 1, 6, 9, 13, 16 ± 4,37 mg/kg ≡ 87,3 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 12,6 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 14,4 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, Tween 80 a 2% - pH 7,6.

3) 7 ratos, 31 g de peso médio, 355 mm^3 volume mediano médio do tumor no dia da randomização: 2,4 mg/kg AE-Ester-Sulf07 (AE equiv.) administrado duas vezes por semana durante 3 semanas no dia 1, 6, 9, 13, 16 ± 4,37 mg/kg ≡ 87,3 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 12,6 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 14,4 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, 4% de 2-HPßCD - pH 7,6.

[0243] O desenvolvimento do crescimento tumoral no modelo de xenoenxerto de melanoma A375 mostra uma melhora antitumoral estatisticamente significativa do composto AE-Éster-Sulf07 doseado a 2,4 mg/kg (independentemente do tampão de reconstituição, 2% de Tween 80 ou 4% de 2-HPßCD) em comparação à auristatina E doseada a 0,3 mg/kg, injetado cinco vezes duas vezes por semana ($p < 0,01$ do dia 9 ao 33). O tratamento com Auristatina E mostrou doença inicial estável até o dia 14, após o qual os tumores cresceram de forma constante. No entanto, os camundongos tratados com AE-Éster-Sulf07 alcançaram remissão quase completa do dia 16 até o final do estudo no dia 37, atingindo um mínimo de 4 mm^3 no dia 23 e 1 mm^3 no dia 26 para o AE-Éster-Sulf07 reconstituído com 2% de Tween 80 e 4% de 2-HPßCD, respectivamente, apesar do grande volume mediano do tumor no início do experimento.

[0244] Nenhuma mudança significativa no peso corporal em relação ao controle foi registrada, mas feridas por mordidas e arranhões foram observadas a partir do dia 9. O tratamento com Bepanteno melhorou a saúde dos camundongos feridos. Apenas um camundongo no grupo tratado com AE-Éster-Sulf07 2% Tween 80 teve que ser sacrificado por más condições gerais.

Avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina

AE-Éster-Sulf07 em um modelo humano de câncer de pulmão de células não pequenas, LXFA737 - tumores pequenos (Figura 21).

[0245] A avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Éster-Sulf07 em um modelo de câncer de pulmão de células não pequenas humanas LXFA737 foi realizado como descrito no procedimento geral para modelos de xenoenxerto derivados de paciente

[0246] As soluções de estoque foram preparadas da seguinte forma:

1) 7 camundongos, 27 g de peso médio, 137 mm^3 volume mediano médio do tumor no dia da randomização: 0,3 mg/kg de sal de auristatina E TFA (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas no dia 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 ≡ 0,35 mg/kg ≡ 7,1 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 2 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 28,3 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,2 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, 20% de propilenoglicol - pH 7,0.

2) 7 camundongos, 27 g de peso médio, 126 mm^3 volume médio de tumor no dia da randomização: 2,4 mg/kg AE-Éster-Sulf07 (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas no dia 0, 4, 7, 11 , 14, 18, 21, 25 ≡ 4,37 mg/kg ≡ 87,3 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 31 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 28,5 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 0,96 mL foram doseados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, 4% de 2-HPßCD - pH 7,6.

[0247] O desenvolvimento do crescimento tumoral no modelo de xenoenxerto NSCLC LXFE737 mostrou eficácia antitumoral superior do composto AE-Éster-Sulf07

a 2,4 mg/kg versus auristatina E a 0,3 mg/kg, ambos doseados 8 vezes duas vezes por semana com significância estatística ($p < 0,05$ no dia 56 e 63). Os tumores no grupo tratado com auristatina E permaneceram apenas temporariamente em um estado estável da doença do dia 21 ao dia 42 e cresceram significativamente após o final da terapia. Por outro lado, os ratos tratados com AE-Éster-Sulf07 alcançaram remissão completa do tumor no dia 21, diminuindo o volume do tumor para um nível incomensurável até o final do estudo no dia 74, resultando em um efeito antitumoral a longo prazo.

[0248] Durante o curso do estudo, cinco ratos tiveram que ser sacrificados devido a uma combinação de perda de peso corporal e lesões na pele.

Avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Éster-Sulf07 em um carcinoma ovariano humano modelo A2780 - tumores grandes (Figura 22).

[0249] A avaliação da auristatina E e do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Éster-Sulf07 em um carcinoma ovariano humano modelo A2780 foi realizada conforme descrito no procedimento geral para modelos de xenoenxerto derivados de linhagem celular.

[0250] As soluções de estoque foram preparadas da seguinte forma:

1) 8 camundongos, 28 g de peso médio, 341 mm^3 volume mediano médio do tumor no dia da randomização: 0,3 mg/kg de sal de auristatina E TFA (AE equiv.) doseados duas vezes por semana durante 4 semanas no dia 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 ≡ 0,35 mg/kg ≡ 7,1 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 3,7 mg pesados em um frasco de 100 mL dissolvidos em 52,3 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,5 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, 20%

de propilenoglicol - pH 7,0.

2) 8 camundongos, 27 g de peso médio, 403 mm^3 volume mediano médio de tumor no dia da randomização: 1,9 mg/kg AE-Éster-Sulf07 (AE equiv.) doseados uma vez por semana durante 4 semanas nos dias 1, 4, 8, 11 , 15, 18, 22, 25 ≡ 3,46 mg/kg ≡ 69,2 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 36,5 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 26,4 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 0,75 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, 2% de 2-HPßCD - pH 7,6.

[0251] O AE-Éster-Sulf07 administrado na dose de 1,9 mg/kg mostra eficácia antitumoral superior no carcinoma ovariano modelo A2780 em comparação à auristatina E doseada a 0,3 mg/kg, ambos injetados oito vezes duas vezes por semana ($p < 0,001$ do dia 37 ao dia 40) . Os camundongos tratados com auristatina E não obtiveram nenhum efeito antitumoral. No entanto, os camundongos tratados com AE-Éster-Sulf07 mostraram uma remissão parcial do dia 19 até o dia 51 e remissão completa do dia 54 até o final do estudo no dia 103, resultando em regressão do tumor a longo prazo.

[0252] Os camundongos tratados com AE-Éster-Sulf07 não apresentaram sinais de perda de peso corporal em comparação com o controle, mas quatro animais tiveram que ser removidos do estudo devido à necrose tumoral.

Avaliação de compostos derivados da auristatina E de ligação à albumina AE-Éster-Sulf07 em um carcinoma ovariano humano modelo A2780 - tumores pequenos (Figura 23).

[0253] A avaliação do derivado da auristatina E de ligação à albumina AE-Éster-Sulf07 em um carcinoma ovariano humano modelo A2780 foi realizada conforme descrito no procedimento geral para modelos de xenoenxerto derivados de

linhagem celular.

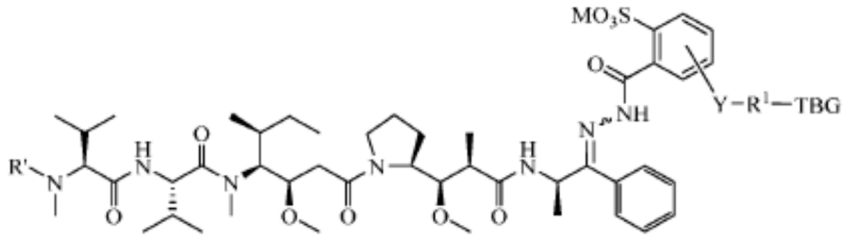
[0254] As soluções de estoque foram preparadas da seguinte forma:

1) 8 camundongos, 27 g de peso médio, 174 mm^3 volume mediano médio de tumor no dia da randomização: 3,8 mg/kg AE-Éster-Sulf07 (AE equiv.) doseados uma vez por semana durante 4 semanas nos dias 1, 8, 15, 22 ≡ 6,67 mg/kg ≡ 133,4 μg/20 g de camundongo. Preparação da amostra: 25,6 mg pesados em um frasco de 30 mL dissolvidos em 19,2 mL de 50/50 *terc*-butanol/tampão fosfato de sódio 10 mM, sacarose 5% - pH 7,0; 1,5 mL foram aliquotados em frascos de 4 mL. Os frascos foram congelados por 1 h a -40 °C e liofilizados a -20 °C por ~36 h e depois tampados. No dia da injeção, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, 6% de 2-HPßCD - pH 7,6.

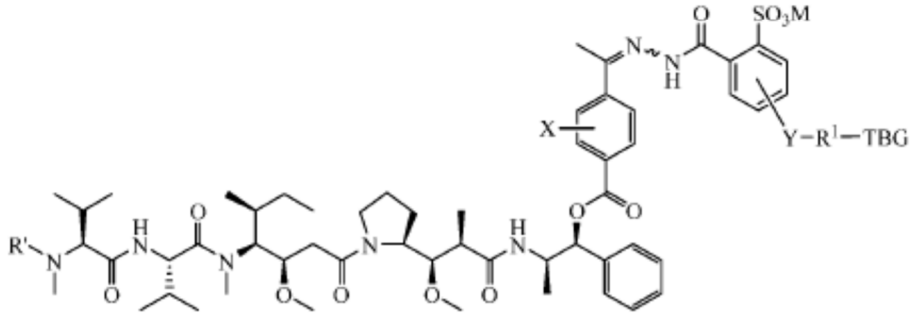
[0255] O AE-Éster-Sulf07 também foi testado no mesmo modelo de carcinoma ovariano A2780 com tumores menores e um esquema de dosagem diferente para diminuir os efeitos colaterais da droga na pele dos camundongos. O AE-Éster-Sulf07 foi administrado em 3,8 mg/kg quatro vezes uma vez por semana, mostrando novamente um efeito antitumoral estatisticamente significativo comparado ao controle ($p < 0,01$ do dia 7 ao 14). Os camundongos tratados com AE-Éster-Sulf07 no novo regime de dosagem alcançaram remissão parcial do dia 12 até o dia 35 e remissão completa do dia 39 até o final do estudo no dia 70. Três ratos tratados com AE-Éster-Sulf07 mostraram perda de peso corporal e tiveram que ser sacrificados no dia 59.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tem a estrutura de Fórmula I ou II:



Fórmula I



Fórmula II

ou um sal, hidrato, solvato ou isômero farmaceuticamente aceitável do mesmo;

em que:

R’ é H ou -CH_3,

M é H ou um contraíon farmaceuticamente aceitável;

Y está ausente ou é selecionado de um C_1-C_6 alquil opcionalmente substituído, -NH-C(O)-,

-C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -C(O)-O- e -OC(O)-;

R^1 está ausente ou é um C_1-C_{18} alquil opcionalmente substituído, em que opcionalmente até seis átomos de carbono no referido C_1-C_{18} alquil são cada um independentemente substituídos por -OCH_2CH_2-;

X é H ou selecionado de halogêneo (por exemplo, -F, -Cl, -Br ou -I), -NO_2, -NR^2R^3, -OR^2, -$NHCOR^2$ e -$OCOR^2$, em que R^2 e R^3 são cada qual selecionados

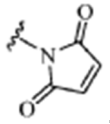
independentemente de H e C_1-C_4 alquil;

TBG é um grupo de ligação de tiol selecionado de um grupo maleimida opcionalmente substituído, um grupo haloacetamida opcionalmente substituído, um grupo haloacetato opcionalmente substituído, um grupo piridiltio opcionalmente substituído, um grupo isotiocianato opcionalmente substituído, um grupo vinilcarbonil opcionalmente substituído, um grupo aziridina opcionalmente substituído, um grupo dissulfeto opcionalmente substituído e um grupo acetileno opcionalmente substituído.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que R' é -CH_3.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que TBG é selecionado de um grupo maleimida opcionalmente substituído.

4. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que TBG é um grupo maleimida da fórmula:


.

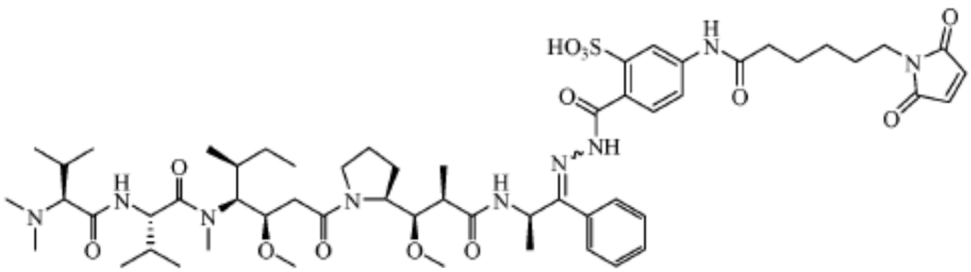
5. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que Y é -NH-C(O)-.

6. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que M é H^+ ou Na^+.

7. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que R^1 é um C_1-C_5 alquil opcionalmente substituído.

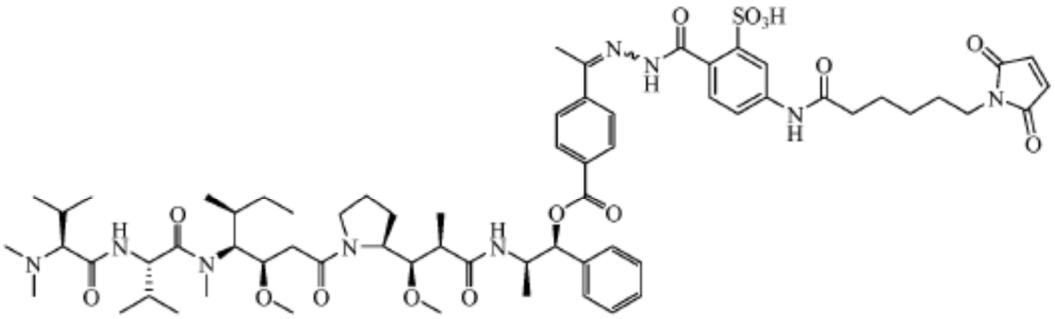
8. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADO** pelo fato que R^1 é C_1-C_5 alquil.

9. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que tem a estrutura de Fórmula III:



Fórmula III

10. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que possui a estrutura da Fórmula IV:



Fórmula IV

11. Composição farmacêutica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um composto de qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e um transportador farmaceuticamente aceitável.

12. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o transportador farmaceuticamente aceitável é selecionado de um ou mais de um agente solubilizante, um agente encapsulante e um lioprotetor.

13. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o transportador farmaceuticamente aceitável compreende um ou mais de dimetil-β-ciclodextrina, hidroxietil-β-ciclodextrina, hidroxipropil-β-ciclodextrina e trimetil-β-ciclodextrina.

14. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição farmacêutica é adequada para administração intravenosa.

15. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 143, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição, quando administrada intravenosamente a um paciente, liga covalentemente de maneira seletiva e rápida *in situ* a albumina endógena na circulação sanguínea.

16. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição, quando administrada intravenosamente a um paciente, liga covalentemente seletivamente e rapidamente *in situ* a um grupo tiol de cisteína-34 de albumina endógena na circulação sanguínea.

17. Método para tratar um paciente sofrendo de uma doença selecionada de um câncer, uma doença de vírus, doença autoimune, doença inflamatória aguda ou crônica e uma doença causada por bactérias, fungos e outros microrganismos, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao paciente em necessidade do mesmo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de qualquer das reivindicações 1 a 10 ou uma composição farmacêutica de acordo qualquer das reivindicações 11 a 16.

18. Método, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença é câncer selecionado de carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiplo e melanoma.

19. Método, de acordo com a reivindicação 17 ou 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a administração é administração intravenosa.

20. Método para reduzir citotoxicidade de um composto, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar um composto de qualquer das reivindicações 1 a 10 ou uma composição farmacêutica de qualquer das reivindicações 11 a 16 a um paciente em necessidade do mesmo, em que a administração resulta em uma redução na citotoxicidade quando comparada com uma dose equivalente de agente ativo não modificado.

21. Método para aumentar a concentração de um metabólito de um composto em um tumor, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar o composto de qualquer das reivindicações 1 a 10 ou uma composição farmacêutica de qualquer das reivindicações 11 a 16 a um paciente em necessidade do mesmo, em que o aumento é comparado a uma dose equivalente de agente ativo não modificado.

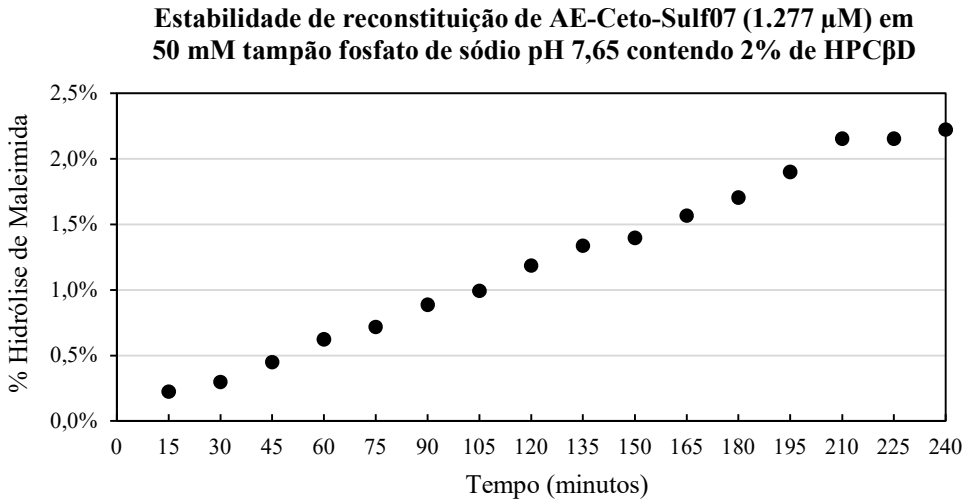
22. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para uso como um medicamento.

23. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para uso no tratamento de uma doença ou condição selecionada do grupo que consiste em um câncer, uma doença de vírus, uma doença autoimune, uma doença inflamatória aguda ou crônica e uma doença causada por bactérias, fungos ou outros microrganismos.

24. Uso de um composto de qualquer uma das reivindicações 1 a 10 ou de uma composição das reivindicações 11 a 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é na preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou condição selecionada de um câncer, uma doença de vírus, uma doença autoimune, doença inflamatória aguda ou crônica e uma doença causada por bactérias, fungos ou outro microrganismo.

Figura 1

(a)


Estabilidade de reconstituição de AE-Ceto-Sulf07 (1.277 µM) em 50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,65 contendo 2% de HPCβD
% Hidrólise de Maleimida
2,5%
2,0%
1,5%
1,0%
0,5%
0,0%
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180 195 210 225 240
Tempo (minutos)

(b)

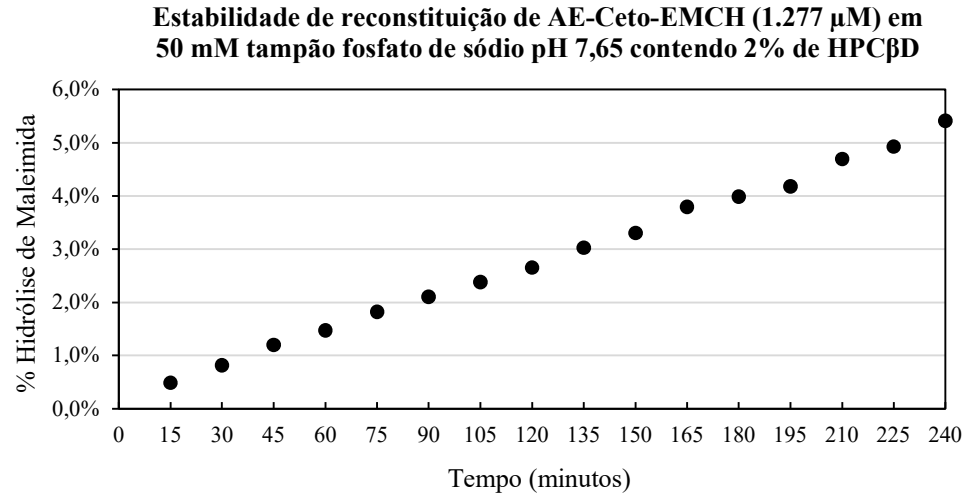
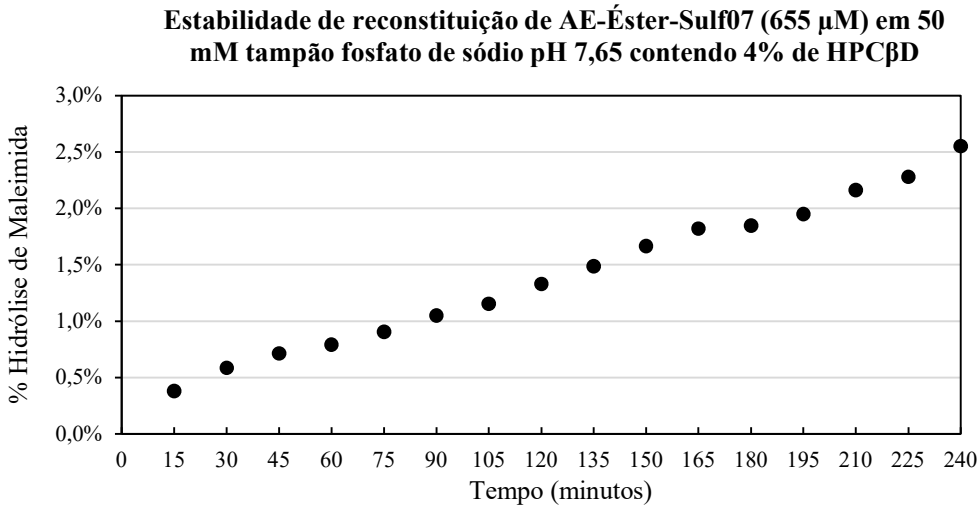

Estabilidade de reconstituição de AE-Ceto-EMCH (1.277 µM) em 50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,65 contendo 2% de HPCβD
% Hidrólise de Maleimida
6,0%
5,0%
4,0%
3,0%
2,0%
1,0%
0,0%
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180 195 210 225 240
Tempo (minutos)

Figura 2

(a)


Estabilidade de reconstituição de AE-Éster-Sulf07 (655 µM) em 50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,65 contendo 4% de HPCβD
% Hidrólise de Maleimida
3,0%
2,5%
2,0%
1,5%
1,0%
0,5%
0,0%
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180 195 210 225 240
Tempo (minutos)

(b)

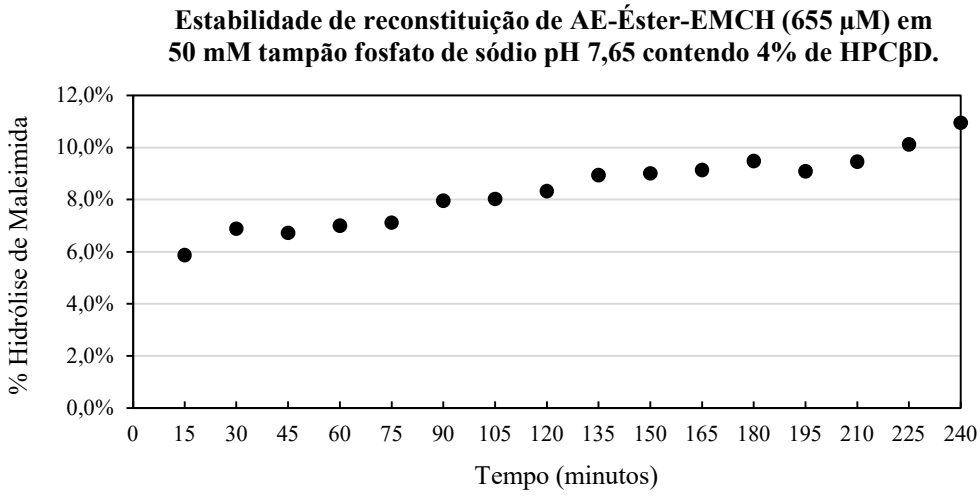
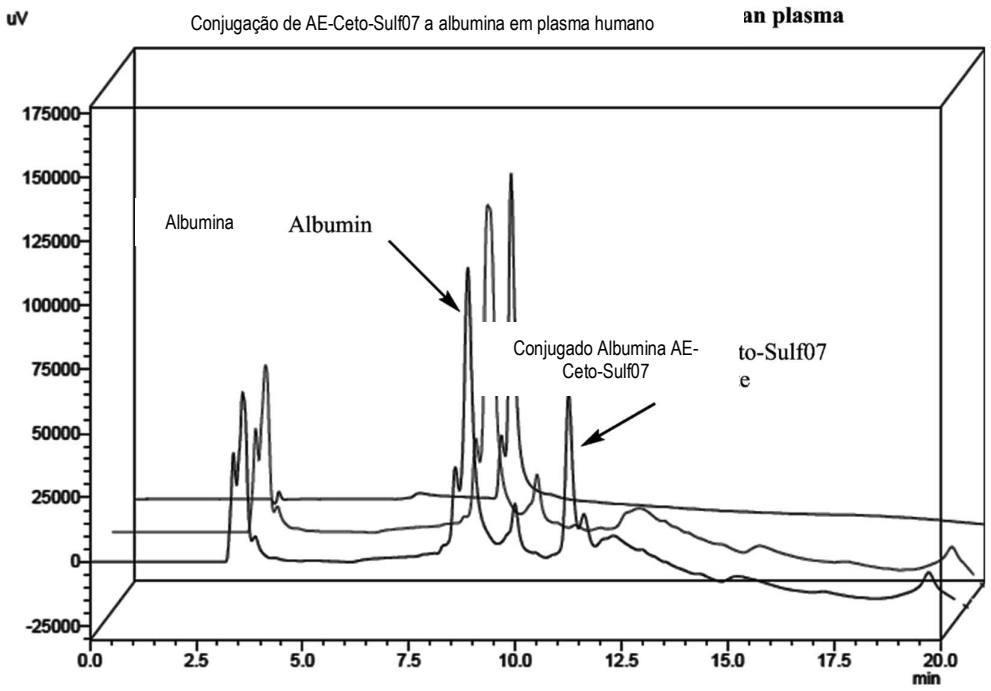

Estabilidade de reconstituição de AE-Éster-EMCH (655 µM) em 50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,65 contendo 4% de HPCβD.
% Hidrólise de Maleimida
12,0%
10,0%
8,0%
6,0%
4,0%
2,0%
0,0%
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180 195 210 225 240
Tempo (minutos)

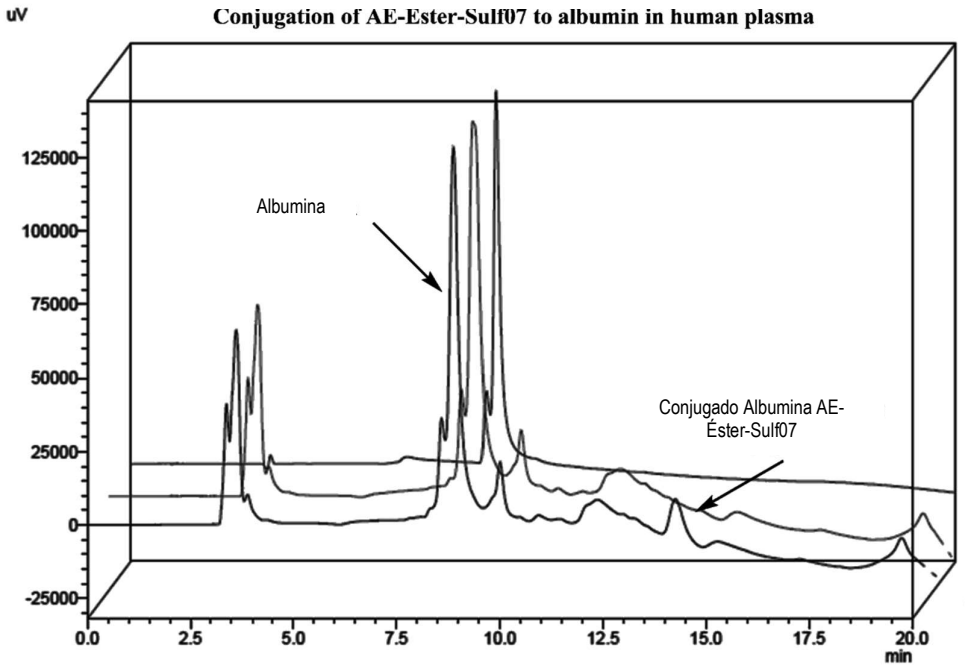
Figura 3



Rastreamento superior: Albumina Humana
Rastreamento médio: Plasma humano com 2-HP-betaciclodexxtrina
Rastreamento inferior: AE-Ceto-Sulf07 em Plasma Humano (5 min.)

Figura 4

Conjugação de AE-Éster-Sulf07 a albumina em plasma humano



Rastreamento superior: Albumina Humana
Rastreamento médio: Plasma humano com 2-HP-betaciclodexxtrina
Rastreamento inferior: AE-Éster-Sulf07 em Plasma Humano (5 min.)

Figura 5

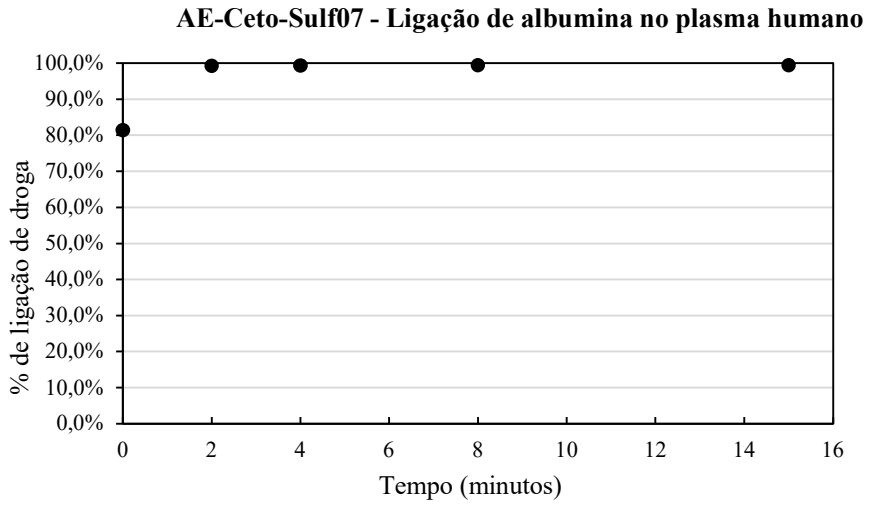

AE-Ceto-Sulf07 - Ligação de albumina no plasma humano
100,0%
90,0%
80,0%
70,0%
60,0%
50,0%
40,0%
30,0%
20,0%
10,0%
0,0%
% de ligação de droga
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Tempo (minutos)

Figura 6

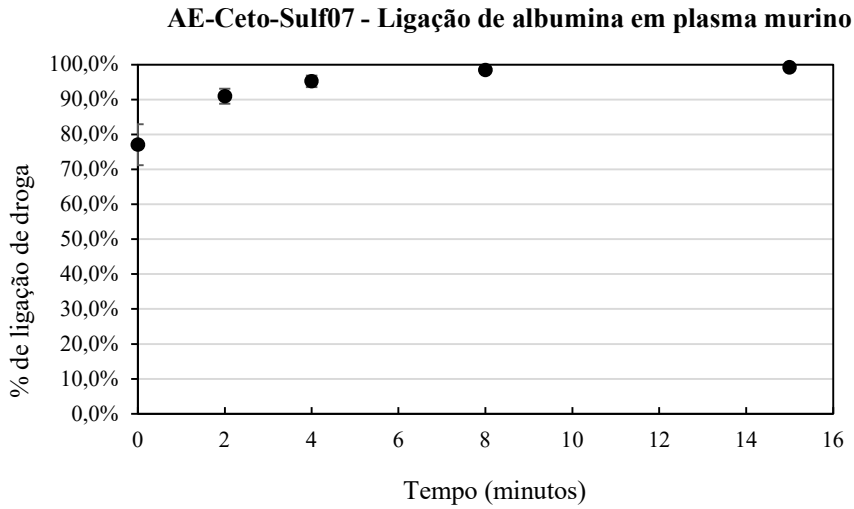

AE-Ceto-Sulf07 - Ligação de albumina em plasma murino
% de ligação de droga
100,0%
90,0%
80,0%
70,0%
60,0%
50,0%
40,0%
30,0%
20,0%
10,0%
0,0%
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Tempo (minutos)

Figura 7

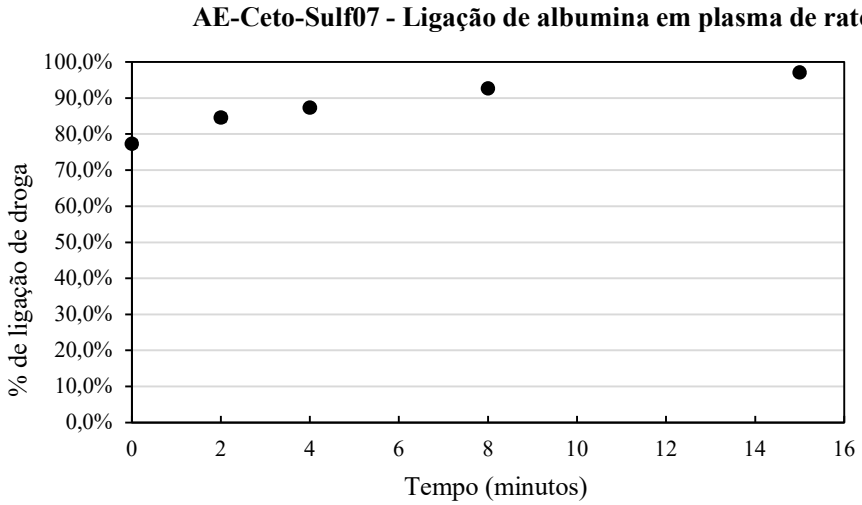

AE-Ceto-Sulf07 - Ligação de albumina em plasma de rato
% de ligação de droga
100,0%
90,0%
80,0%
70,0%
60,0%
50,0%
40,0%
30,0%
20,0%
10,0%
0,0%
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Tempo (minutos)

Figura 8

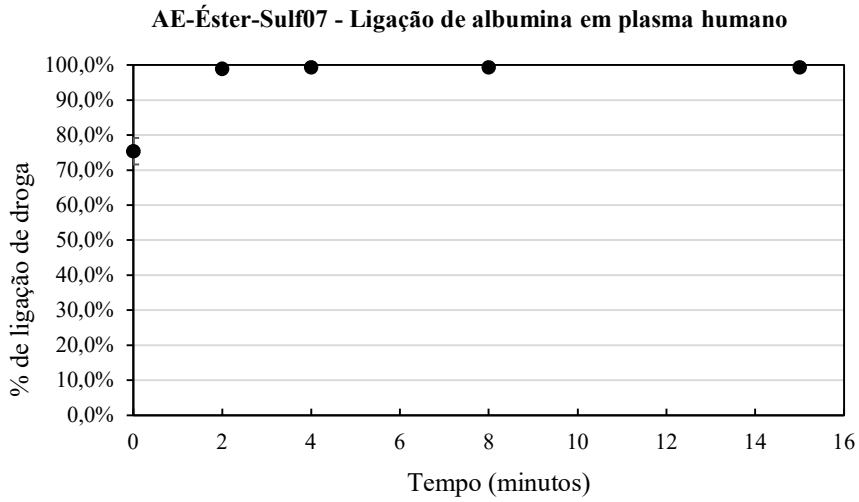

AE-Éster-Sulf07 - Ligação de albumina em plasma humano
% de ligação de droga
100,0%
90,0%
80,0%
70,0%
60,0%
50,0%
40,0%
30,0%
20,0%
10,0%
0,0%
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Tempo (minutos)

Figura 9

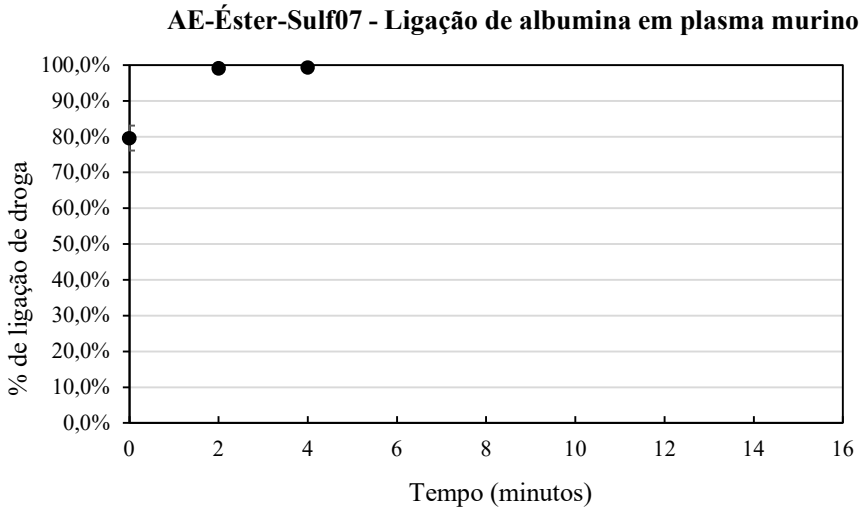

AE-Éster-Sulf07 - Ligação de albumina em plasma murino
100,0%
90,0%
80,0%
70,0%
60,0%
50,0%
40,0%
30,0%
20,0%
10,0%
0,0%
% de ligação de droga
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Tempo (minutos)

Figura 10

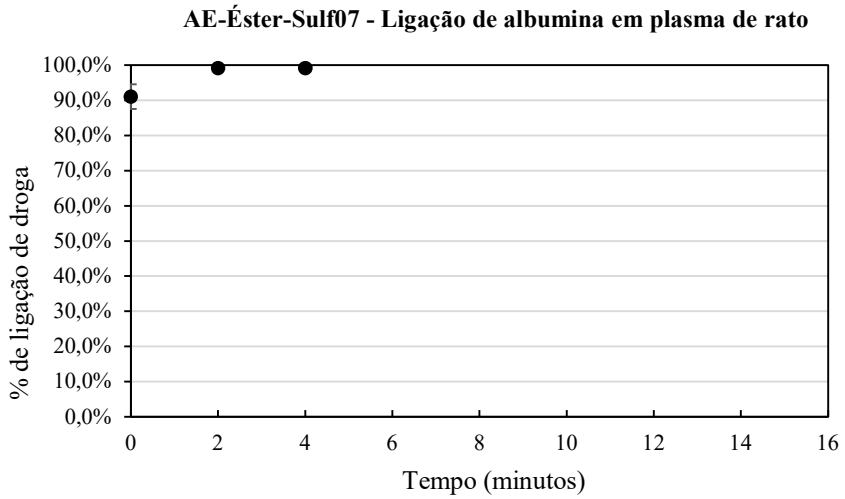
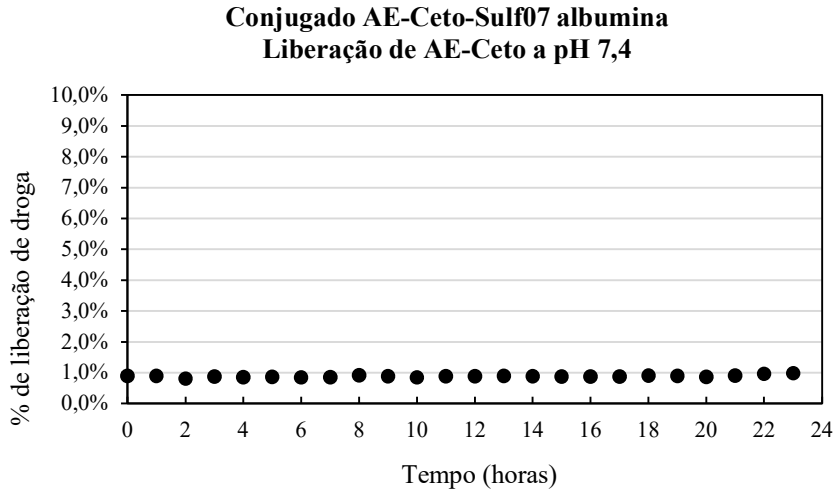

AE-Éster-Sulf07 - Ligação de albumina em plasma de rato
100,0%
90,0%
80,0%
70,0%
60,0%
50,0%
40,0%
30,0%
20,0%
10,0%
0,0%
% de ligação de droga
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Tempo (minutos)

Figura 11


Conjugado AE-Ceto-Sulf07 albumina
Liberação de AE-Ceto a pH 7,4
% de liberação de droga
10,0%
9,0%
8,0%
7,0%
6,0%
5,0%
4,0%
3,0%
2,0%
1,0%
0,0%
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tempo (horas)

(a)

(b)

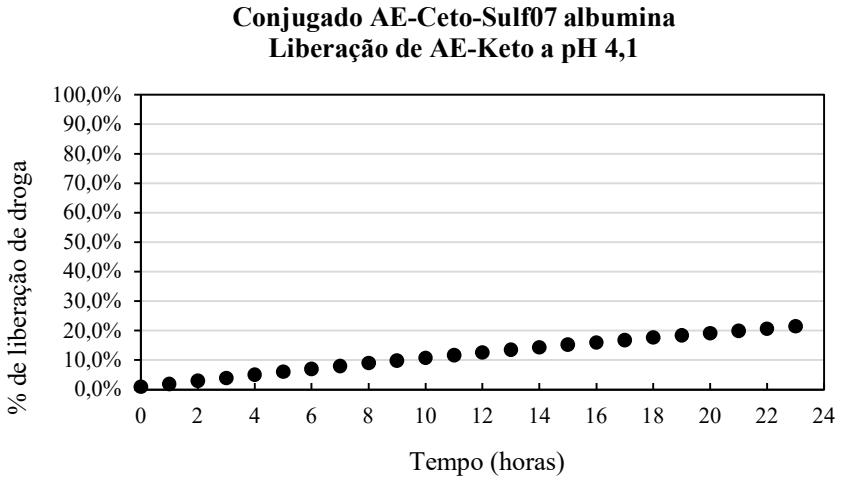
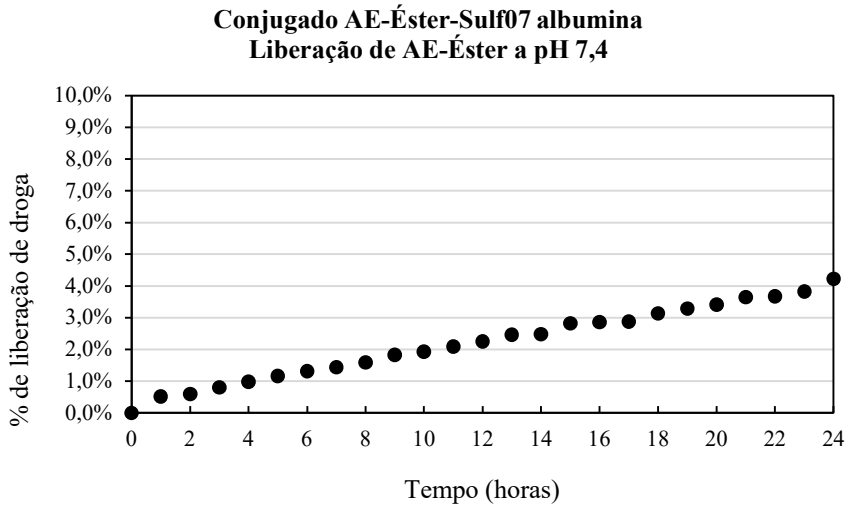

Conjugado AE-Ceto-Sulf07 albumina
Liberação de AE-Keto a pH 4,1
% de liberação de droga
100,0%
90,0%
80,0%
70,0%
60,0%
50,0%
40,0%
30,0%
20,0%
10,0%
0,0%
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tempo (horas)

Figura 12

(a)


Conjugado AE-Éster-Sulf07 albumina
Liberação de AE-Éster a pH 7,4
% de liberação de droga
10,0%
9,0%
8,0%
7,0%
6,0%
5,0%
4,0%
3,0%
2,0%
1,0%
0,0%
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Tempo (horas)

(b)

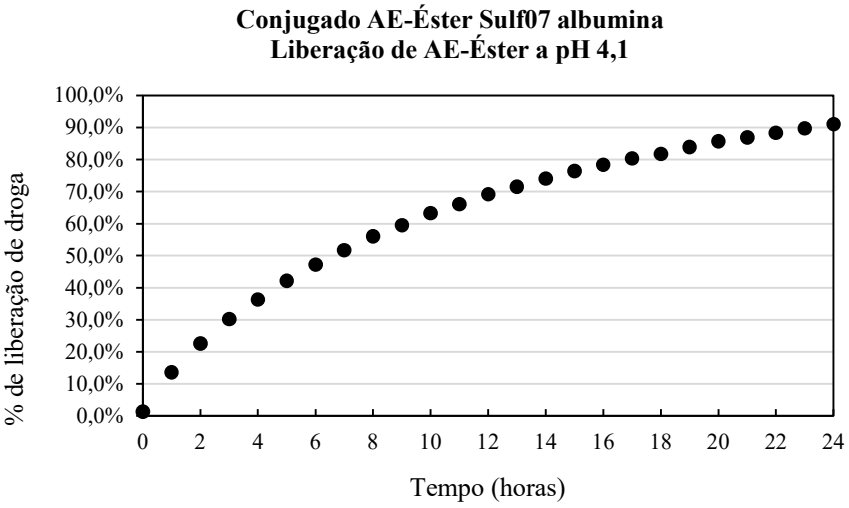

Conjugado AE-Éster Sulf07 albumina
Liberação de AE-Éster a pH 4,1
% de liberação de droga
100,0%
90,0%
80,0%
70,0%
60,0%
50,0%
40,0%
30,0%
20,0%
10,0%
0,0%
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Tempo (horas)

Figura 13

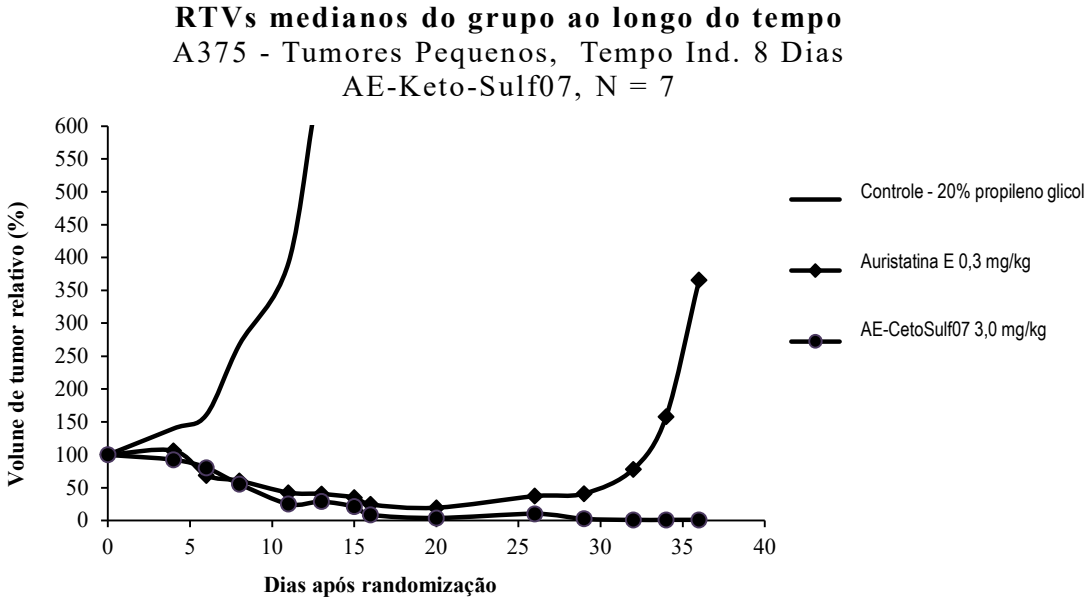

RTVs medianos do grupo ao longo do tempo
A375 - Tumores Pequenos, Tempo Ind. 8 Dias
AE-Keto-Sulf07, N = 7
Volume de tumor relativo (%)
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Dias após randomização
Controle - 20% propileno glicol
Auristatina E 0,3 mg/kg
AE-CetoSulf07 3,0 mg/kg

Figura 14

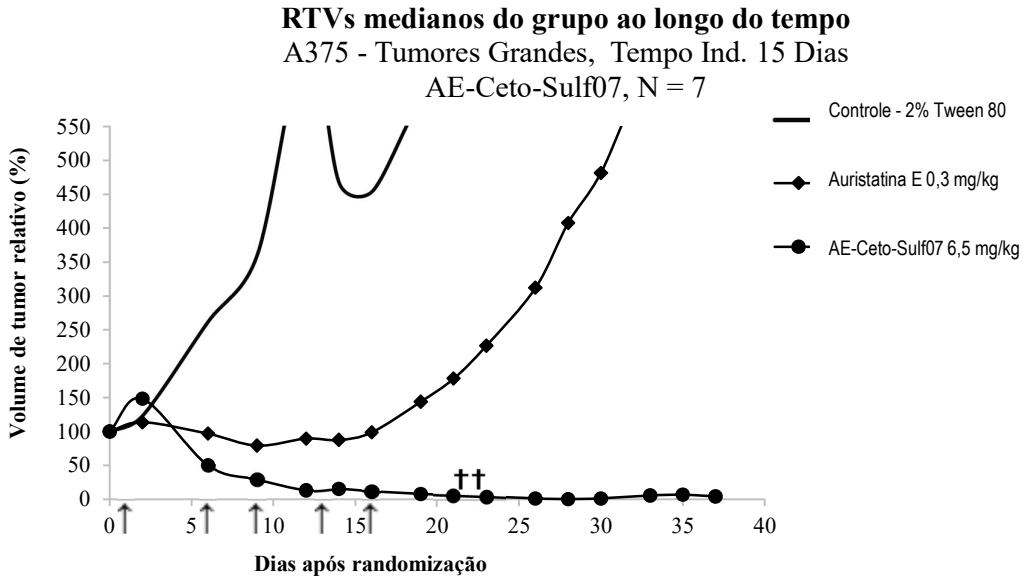

RTVs medianos do grupo ao longo do tempo
A375 - Tumores Grandes, Tempo Ind. 15 Dias
AE-Ceto-Sulf07, N = 7
Controle - 2% Tween 80
Auristatina E 0,3 mg/kg
AE-Ceto-Sulf07 6,5 mg/kg
Volume de tumor relativo (%)
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
††
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Dias após randomização

Figura 15

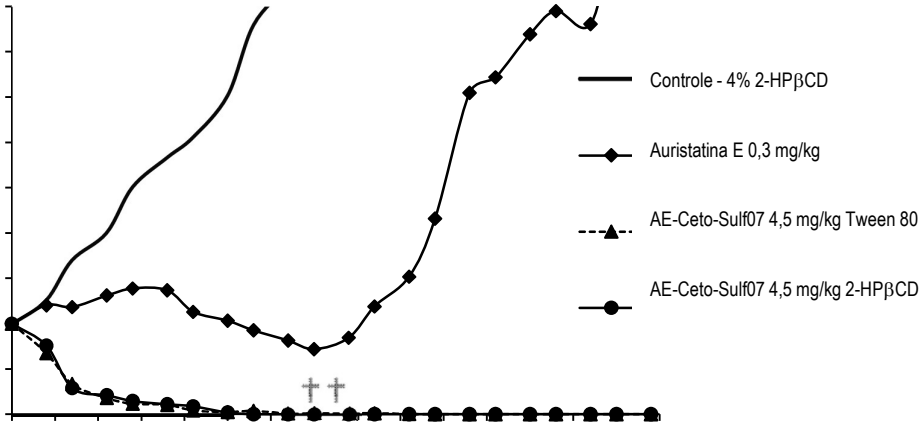

RTVs medianos do grupo ao longo do tempo
Controle - 4% 2-HPβCD
Auristatina E 0,3 mg/kg
AE-Ceto-Sulf07 4,5 mg/kg Tween 80
AE-Ceto-Sulf07 4,5 mg/kg 2-HPβCD

Figura 16

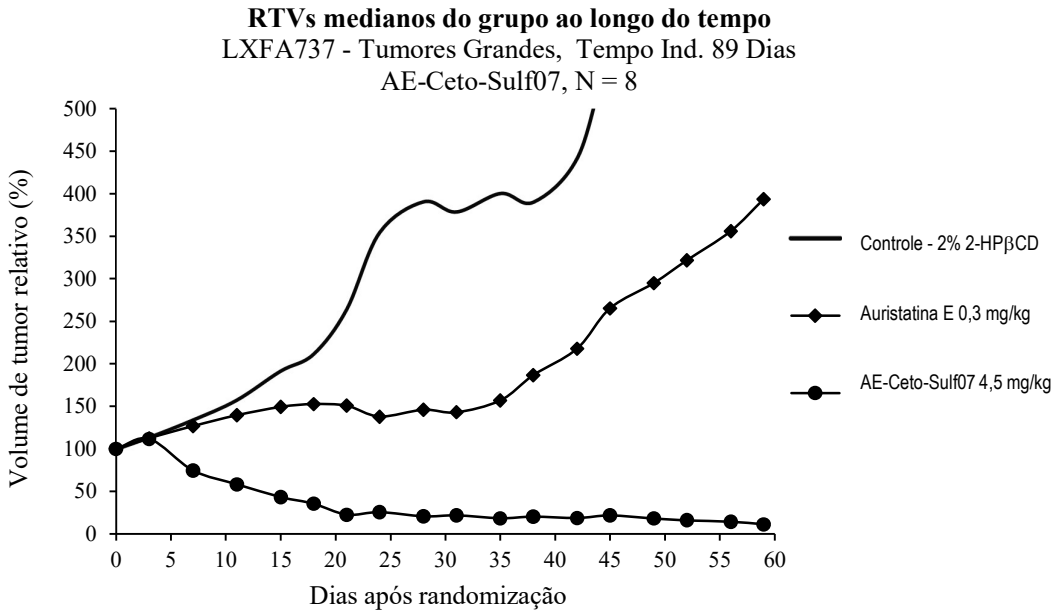

RTVs medianos do grupo ao longo do tempo
LXFA737 - Tumores Grandes, Tempo Ind. 89 Dias
AE-Ceto-Sulf07, N = 8
Volume de tumor relativo (%)
Dias após randomização
Controle - 2% 2-HPβCD
Auristatina E 0,3 mg/kg
AE-Ceto-Sulf07 4,5 mg/kg

Figura 17

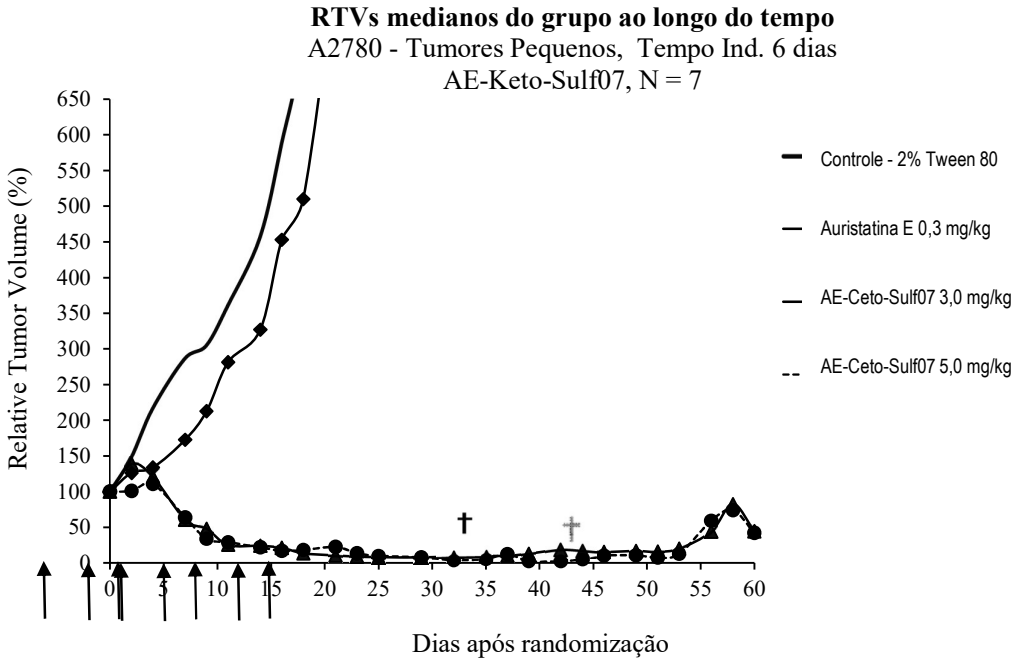

RTVs medianos do grupo ao longo do tempo
A2780 - Tumores Pequenos, Tempo Ind. 6 dias
AE-Keto-Sulf07, N = 7
Relative Tumor Volume (%)
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Dias após randomização
Controle - 2% Tween 80
Auristatina E 0,3 mg/kg
AE-Ceto-Sulf07 3,0 mg/kg
AE-Ceto-Sulf07 5,0 mg/kg

Figura 18

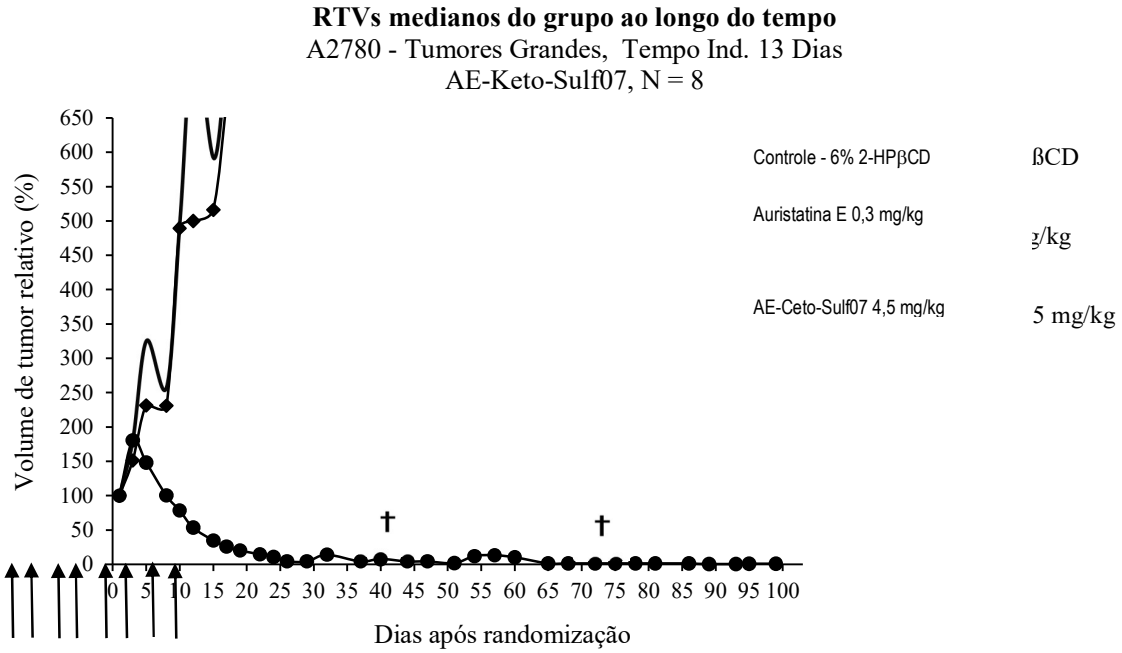

RTVs medianos do grupo ao longo do tempo
A2780 - Tumores Grandes, Tempo Ind. 13 Dias
AE-Keto-Sulf07, N = 8
Volume de tumor relativo (%)
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100
Dias após randomização
†
†
Controle - 6% 2-HPβCD
ßCD
Auristatina E 0,3 mg/kg
g/kg
AE-Ceto-Sulf07 4,5 mg/kg
5 mg/kg

Figura 19

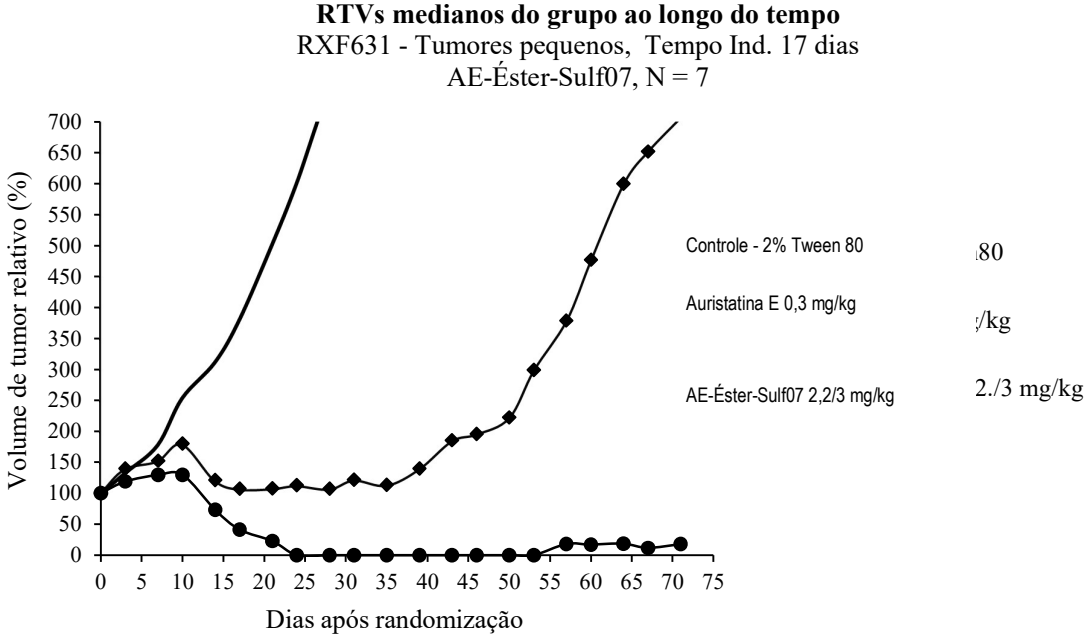

RTVs medianos do grupo ao longo do tempo
RXF631 - Tumores pequenos, Tempo Ind. 17 dias
AE-Éster-Sulf07, N = 7
Volume de tumor relativo (%)
Dias após randomização
Controle - 2% Tween 80
Auristatina E 0,3 mg/kg
AE-Éster-Sulf07 2,2/3 mg/kg

Figura 20

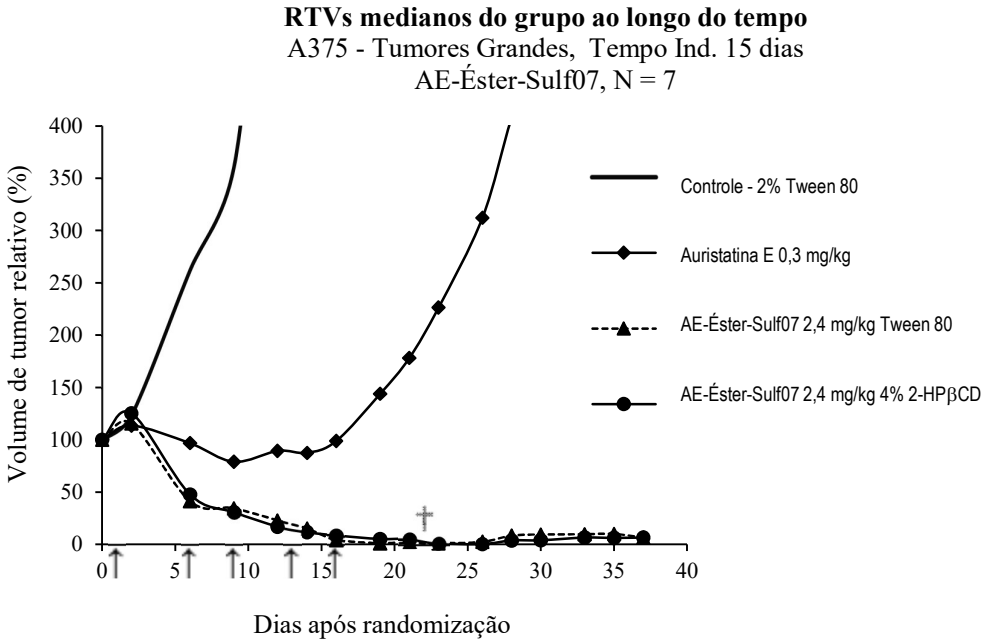

RTVs medianos do grupo ao longo do tempo
A375 - Tumores Grandes, Tempo Ind. 15 dias
AE-Éster-Sulf07, N = 7
Volume de tumor relativo (%)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Dias após randomização
Controle - 2% Tween 80
Auristatina E 0,3 mg/kg
AE-Éster-Sulf07 2,4 mg/kg Tween 80
AE-Éster-Sulf07 2,4 mg/kg 4% 2-HPβCD

Figura 21

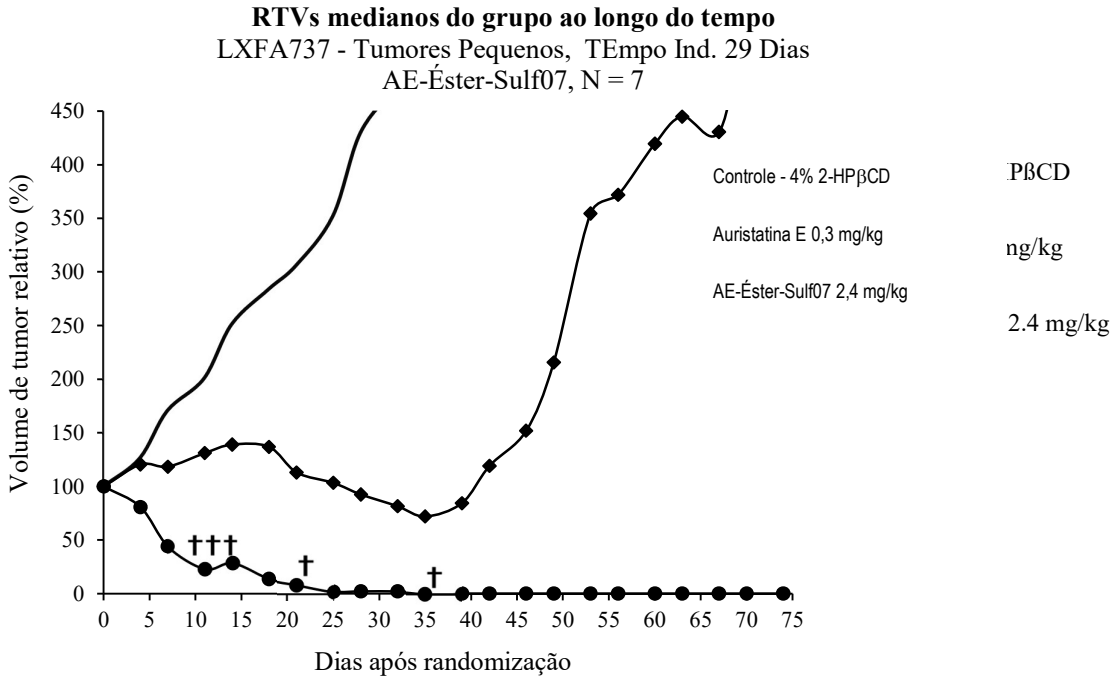

RTVs medianos do grupo ao longo do tempo
LXFA737 - Tumores Pequenos, TEmpo Ind. 29 Dias
AE-Éster-Sulf07, N = 7
Volume de tumor relativo (%)
Dias após randomização
Controle - 4% 2-HPβCD
Auristatina E 0,3 mg/kg
AE-Éster-Sulf07 2,4 mg/kg
PßCD
ng/kg
2.4 mg/kg

Figura 22

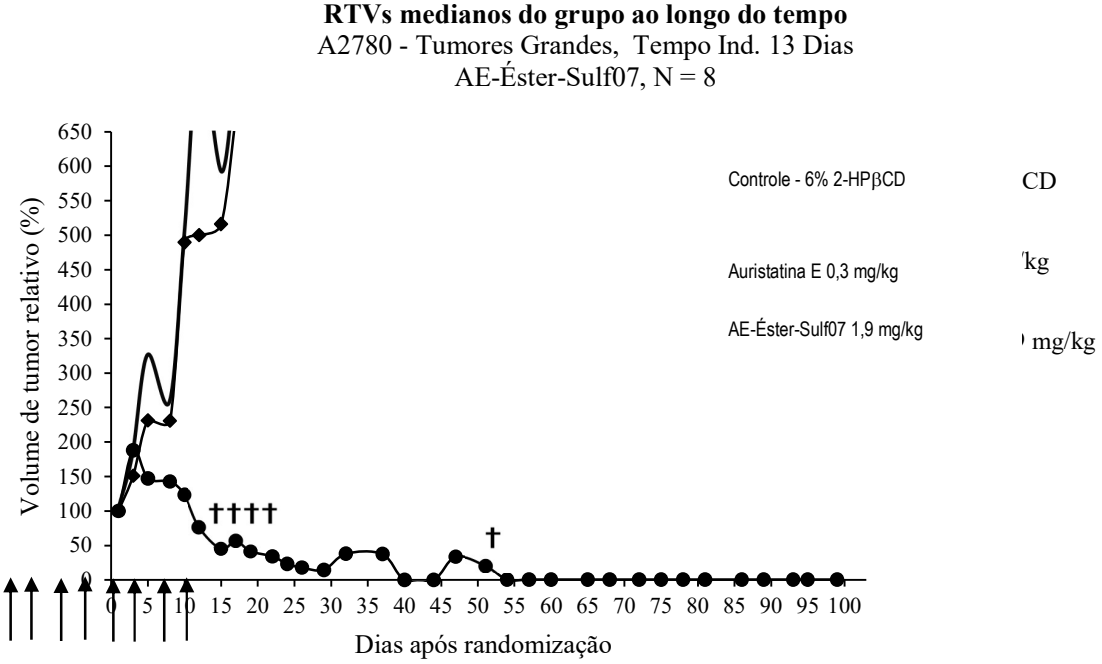

RTVs medianos do grupo ao longo do tempo
A2780 - Tumores Grandes, Tempo Ind. 13 Dias
AE-Éster-Sulf07, N = 8
Volume de tumor relativo (%)
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100
Dias após randomização
††††
†
Controle - 6% 2-HPβCD
Auristatina E 0,3 mg/kg
AE-Éster-Sulf07 1,9 mg/kg
CD
'kg
mg/kg

Figura 23

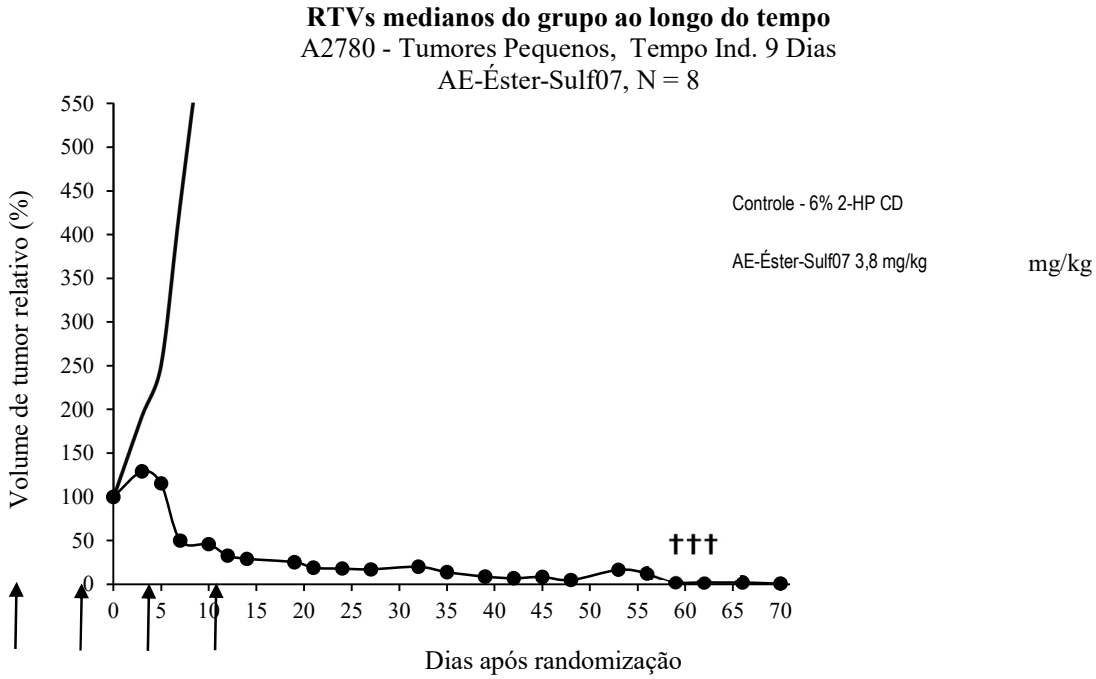

RTVs medianos do grupo ao longo do tempo
A2780 - Tumores Pequenos, Tempo Ind. 9 Dias
AE-Éster-Sulf07, N = 8
Volume de tumor relativo (%)
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
Dias após randomização
Controle - 6% 2-HP CD
AE-Éster-Sulf07 3,8 mg/kg
mg/kg
†††

Figura 24

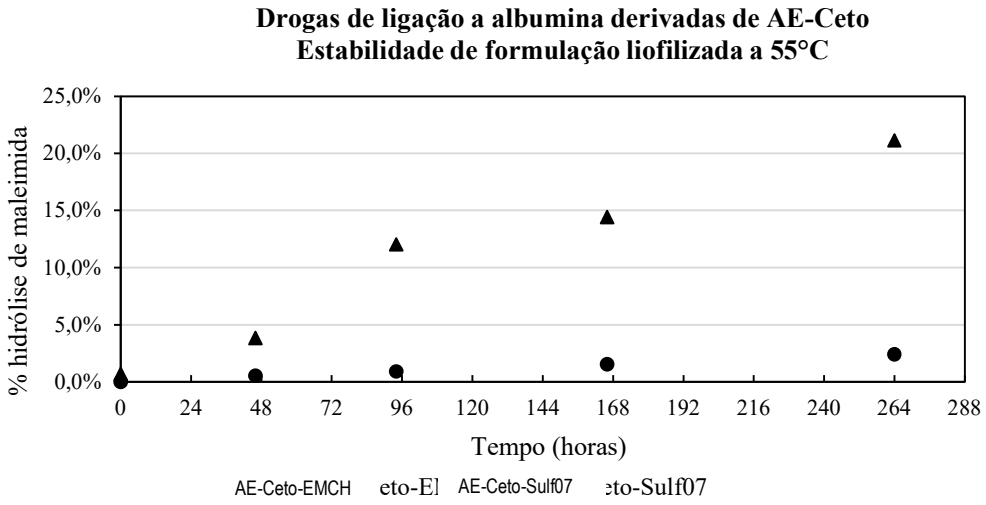
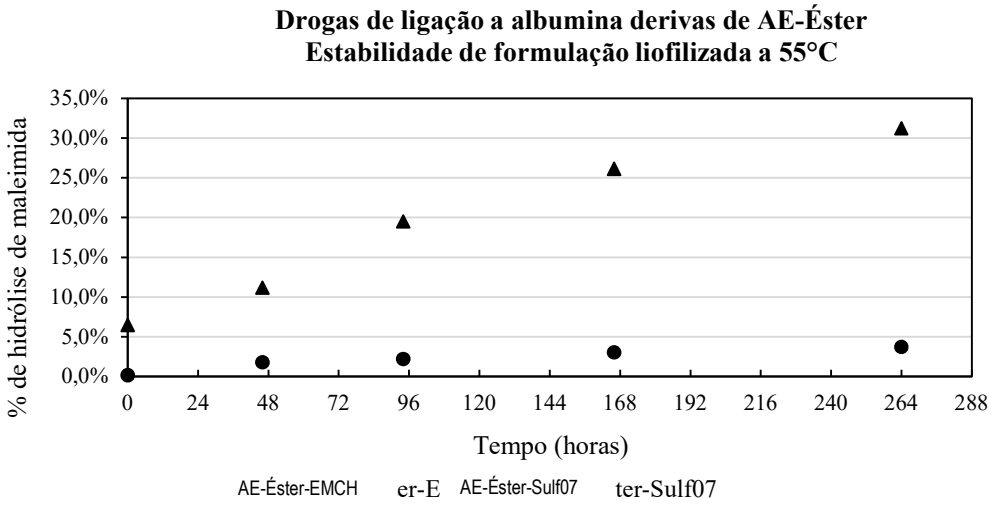

Drogas de ligação a albumina derivadas de AE-Ceto
Estabilidade de formulação liofilizada a 55°C
% hidrólise de maleimida
25,0%
20,0%
15,0%
10,0%
5,0%
0,0%
0
24
48
72
96
120
144
168
192
216
240
264
288
Tempo (horas)
AE-Ceto-EMCH
AE-Ceto-Sulf07

Figura 25


Drogas de ligação a albumina derivas de AE-Éster
Estabilidade de formulação liofilizada a 55°C
% de hidrólise de maleimida
35,0%
30,0%
25,0%
20,0%
15,0%
10,0%
5,0%
0,0%
0
24
48
72
96
120
144
168
192
216
240
264
288
Tempo (horas)
AE-Éster-EMCH
er-E
AE-Éster-Sulf07
ter-Sulf07

RESUMO

“PRÓ-DROGAS DE LIGAÇÃO A ALBUMINA DE DERIVADOS DE AURISTATINA E”

A presente divulgação fornece pró-drogas de ligação a albumina de derivados de auristatina E e usos dos mesmos.