



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

(21) BR 112021001992-8 A2



(22) Data do Depósito: 31/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 04/05/2021

(54) **Título:** EFEITO ADJUVANTE DO AGONISTA TLR1/2 DIPROVOCIM SINERGIZA COM ANTICORPOS INIBIDORES DE CHECKPOINT PARA ELIMINAR DOENÇA

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/4025; A61K 45/06; A61K 9/08; A61P 35/00; A61P 31/04.

(30) **Prioridade Unionista:** 02/08/2018 US 62/713,823.

(71) **Depositante(es):** THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM.

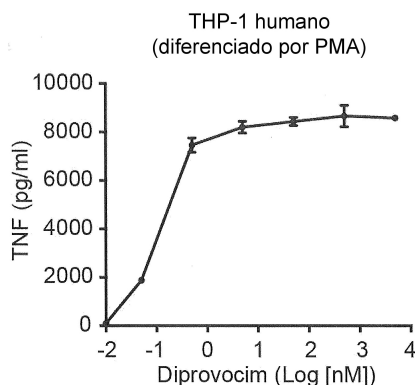
(72) **Inventor(es):** BRUCE BEUTLER; YING WANG.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019044421 de 31/07/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/028532 de 06/02/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 02/02/2021

(57) **Resumo:** EFEITO ADJUVANTE DO DIPROVOCIM AGONISTA DE TLR1/2 SINERGIZA COM ANTICORPOS INIBIDORES DE PONTO DE CONTROLE PARA ELIMINAR DOENÇA. Um potente agonista de receptor Toll-like humano e de camundongo (TLR) 1 / TLR2 foi identificado e otimizado, Diprovocim, que exibiu um EC 50 de 110 pM em células THP-1 humanas e 1,3 nM em macrófagos peritoneais de camundongo primários. Em camundongos, a imunização com ovalbumina com adjuvante Diprovocim promoveu respostas humorais e CTL específicas do antígeno e sinergia com tratamento anti-PD-L1 para inibir o crescimento do tumor, gerando memória antitumoral de longo prazo, curando ou prolongando a sobrevivência de camundongos enxertados com o melanoma B16-OVA. O diprovocim induziu maiores frequências de leucócitos infiltrantes de tumor do que o alúmen, dos quais as células T CD8 foram necessárias para o efeito antitumoral da imunização mais o tratamento anti-PD-L1.



“EFEITO ADJUVANTE DO DIPROVOCIM AGONISTA DE TLR1/2 SINERGIZA COM ANTICORPOS INIBIDORES DE PONTO DE CONTROLE PARA ELIMINAR DOENÇA”

SUPORTE GOVERNAMENTAL

[0001] Esta invenção foi realizada com o suporte governamental sob AI125581 premiada pelo National Institutes of Health. O governo tem certos direitos sobre a invenção.

ANTECEDENTES DA TÉCNICA

[0002] Ao ativar as células de apresentação de antígeno (APCs) que incluem células dendríticas (DCs) e macrófagos, os adjuvantes mantêm o potencial de liberar as funções naturais dos linfócitos T citotóxicos (CTLs) para matar os patógenos ou câncer. Muitos adjuvantes que incluem agonistas de TLR empregam receptores imunes inatos nas APCs, que incluem APCs para apresentar antígenos, produzir citocinas, e fornecer sinais coestimuladores (1, 2) para células T CD8 específicas do antígeno. Em resposta a estes sinais, as células T CD8 proliferam e se diferenciam nos CTLs capazes de matar as células tumorais ou infectadas que expressam seu antígeno alvo. Além disso, tais sinais ativam as células T CD4, que incluem sua expansão e diferenciação nas células T auxiliares Th1 ou Th2 (3).

[0003] Um dos alvos mais importantes da tecnologia adjuvante melhorada encontra-se no campo da imunoterapia contra o câncer, onde o sistema imune adaptável é explorado para matar as células de câncer baseado em sua expressão de antígenos ou neoantígenos associados ao câncer (4, 5). A eficácia da imunoterapia contra o câncer depende da geração e ativação de CTLs específicos do tumor (5, 6) e na sua manutenção da atividade in vivo, que leva à morte das células tumorais e uma resposta da memória antitumor de longa duração (5). Assim, os inibidores do ponto de controle imunológico, tais como, anti-PD-1, anti-PD-L1 e anti-CTLA-4 alcançaram notável sucesso clínico no tratamento de melanoma e outros cânceres através de sua ação no bloqueio de vias que inibem a ativação de CTL (7, 8).

[0004] Entretanto, mesmo entre esses tumores conhecidos por serem suscetíveis ao bloqueio do ponto de controle, taxas de resposta de apenas cerca de 20% foram

relatadas para tratamento com anticorpo PD-1/PD-L1 (5, 9), possivelmente devido aos números insuficientes ou ativação de CTLs reativos ao tumor, ou sua incapacidade de infiltrar tumores. Essas deficiências podem ser exacerbadas pela imunossupressão induzida pelo ambiente do câncer.

[0005] Além disso, acredita-se que a falta de suporte da célula T é seja, pelo menos em parte, responsável pela falta de vigor apresentada por muitas vacinas sintéticas contra vários patógenos, bem como, antígenos de superfície celular relacionados ao câncer. ENREF 21

[0006] Os ligantes de TLR são conhecidos há muito tempo por agirem como adjuvantes nas respostas imunes adaptáveis (10, 11) sinalizando através de proteínas adaptadoras (MyD88, TRIF, TRAM, MAL), quinases, e ubiquitina ligases para ativar NF-kB e IRFs (12 a 14). Estes e outros fatores de transcrição induzem a expressão de milhares de genes que realizam a resposta imune inata (15). Vários adjuvantes com base em nucleotídeo, como, agonista de TLR3 poli I:C (9), agonista de TLR9 CpG (16), e agonista de STING cGAMP (6) foram relatados para melhorar a eficácia dos inibidores do ponto de controle imunológico em modelos pré-clínicos para tratamento de câncer.

[0007] Estas abordagens visam aumentar o número de CTLs específicos do tumor em que os inibidores do ponto de controle podem agir. Entretanto, eles têm contado principalmente com ligantes naturais de TLR, que são difíceis de sintetizar, e em alguns casos bastante tóxicos, presumivelmente porque se tornam amplamente disseminados in vivo, e ativam as células mieloides indiscriminadamente, que produz tempestade de citocinas (17). Buscou-se o desenvolvimento de agonistas com propriedades farmacológicas superiores, com mecanismos moleculares e estruturais definidos a partir dos quais os principais princípios do projeto adjuvante podem ser descobertos.

[0008] Ao rastrear uma biblioteca de compostos sintéticos, identificou-se um potente agonista de TLR1/2 ativo de camundongo e ser humano, Diprovocim, que não tem similaridade estrutural com qualquer agonista de TLR microbiano. Como descrito abaixo, o Diprovocim retira ilustrativamente forte atividade adjuvante nos

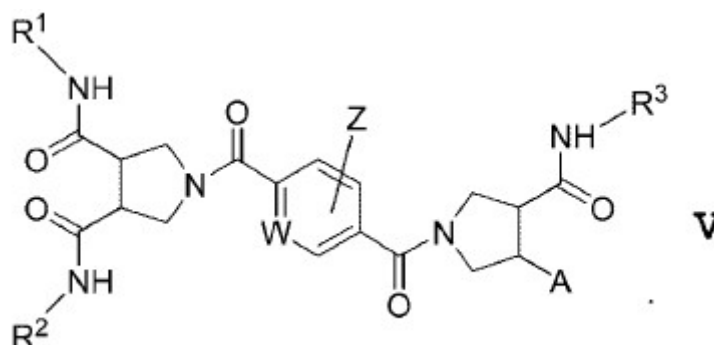
camundongos, inibindo de forma bem sucedida o desenvolvimento do tumor e que prolonga a sobrevivência quando combinado com um antígeno de câncer e bloqueio do ponto de controle imunológico no modelo de melanoma B16-OVA.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0009] Os adjuvantes aumentam as respostas imunes adaptáveis, algumas vezes através de mecanismos desconhecidos, e podem ser usados para aumentar ambas as respostas celulares e humorais aos antígenos de câncer. A invenção descrita neste documento ilustra os efeitos imunológicos sinérgicos do Diprovocim adjuvante químico sintético, que alveja o receptor imune inato TLR2/TLR1 nos camundongos e seres humanos que, quando usado em conjunto com uma molécula de imunógeno marcador de célula doente e um inibidor do ponto de controle fornece um efeito sinérgico na inibição do desenvolvimento de uma célula doente quando comparado ao uso dos componentes individuais ou quaisquer dois desses componentes.

[0010] A presente invenção, assim, contempla um método para inibir o desenvolvimento de células doentes em um mamífero. Essas células doentes expressam uma molécula marcadora que está ausente fora das células do mesmo tipo que estão livres da doença ou está presente nas células livres da doença em números reduzidos significativamente comparado às ditas células doentes. Um método contemplado compreende as etapas de imunização de um mamífero doente com necessidade de: a) administrar ao mamífero doente (i) uma quantidade suficiente de adjuvante de um composto de Diprovocim, (ii) uma quantidade estimuladora de célula T de um inibidor do ponto de controle imunológico, e (iii) uma quantidade imunizante de uma molécula marcadora de doença. O mamífero imunizado é b) mantido durante um período de tempo suficiente para o mamífero montar uma resposta imune à imunização e inibir o desenvolvimento de células doentes.

[0011] Um composto de Diprovocim contemplado corresponde na estrutura à Fórmula estrutural V,



em que

-A é -H (hidrido) ou -C(O)NH-R⁴;

R¹, R², R³ e R⁴ são os mesmos ou diferentes e são uma 2-(4-fluorofenil)etila, uma trans-2-fenilciclopropila, uma trans-2-(4-fluorofenil)-ciclopropila ou um grupo de hidrocarbila C₂-C₁₈ com as condições de que:

1) pelo menos dois de R¹, R², R³ e R⁴ (R¹⁻⁴) ou pelo menos dois de R¹, R², e R³ (R¹⁻³) são uma trans-2-fenilciclopropila, um grupo de trans-2-(4-fluorofenil)-ciclopropila ou uma mistura dos mesmos, ou cada um de R¹⁻⁴ é um grupo de 2-(4-fluorofenil)etila,

2) pelo menos um grupo de pirrolidinildicarboxamido representado tem a configuração (S,S), e cada substituinte de R representado diferente de um grupo de hidrocarbila C₂-C₁₈ é uma trans-2-fenilciclopropila, um grupo de trans-2-(4-fluorofenil)-ciclopropila ou uma mistura dos mesmos quando cada um de R¹⁻⁴ diferente de 2-(4-fluorofenil)etila,

3) não mais do que dois de R¹⁻⁴ são grupos de hidrocarbila C₂-C₁₈ quando -A é -C(O)NH-R⁴, e

4) quando A é hidrido, um de R¹⁻³ pode ser um grupo de hidrocarbila C₂-C₁₈ e o grupo de pirrolidinilcarboxamido contendo R³ representado pode ter ou as configurações R ou S, ou uma mistura de ambas configurações;

-Z é um ou mais de halogênio -H, -NH₂, -OH, -OCH₃, -NO₂, -OCH₂CO₂H, -O (CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONH(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -NHCOCH₂O-(CH₂CH₂O)_nCH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCHCO₂H(CH₂CO₂H), -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)

$(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{OCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CONHCH}(\text{CHOH})$
 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{OCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CONHCH} \quad [(\text{CH}_2)_4\text{nh}_2]\text{CO}_2\text{H}$, $-$
 $\text{OCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CONHCH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CO}\{\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]\text{CO}\}_m\text{NHCH}-$
 $[(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]\text{CO}_2\text{H}$ (SEQ ID NOS: 3 a 8), $-$
 $\text{OCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CO}\{\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]\text{CO}\}_p\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]\text{CO}_2\text{H}$ (SEQ ID NOS: 9-
 13) e $-\text{OCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CO}\{\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CO}\}_q\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CO}_2\text{H}$ (SEQ ID NOS:
 14-18);

W é nitrogênio (N) ou CH;

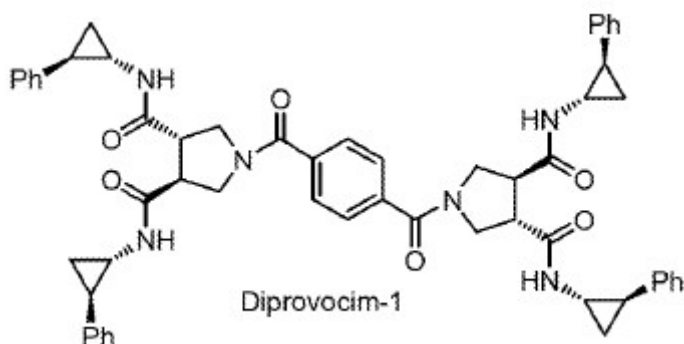
"n" é um número cujo valor médio é um em torno de oito;

"m" é um número cujo valor é de 1 a cerca de 6;

"p" é um número cujo valor é de 1 a cerca de 6; e

"q" é um número cujo valor é de 1 a cerca de 6.

[0012] O Diprovocim-1 (WO 2018/005812; Composto 3) apresentou forte atividade adjuvante nos camundongos, particularmente estimulando respostas imunes celulares.



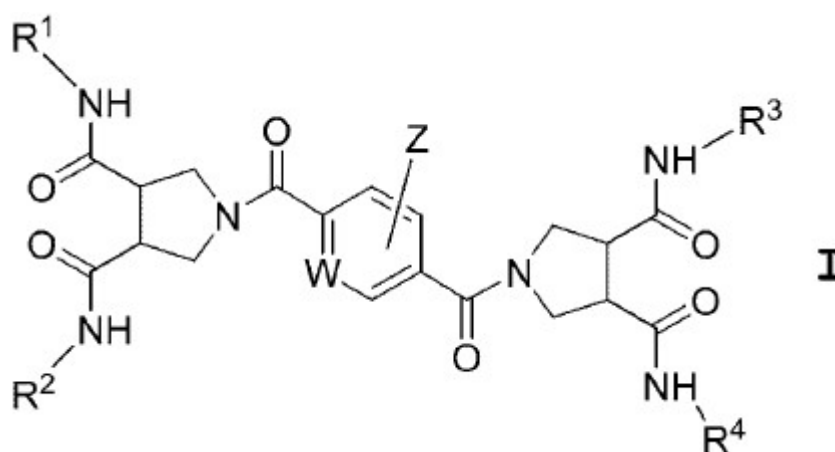
[0013] A imunização contra um antígeno específico do tumor modificado geneticamente, ovalbumina, quando adjuvada com Diprovocim-1, inibiu o desenvolvimento de melanoma B16 e prolongou a sobrevivência na presença de bloqueio do ponto de controle imunológico por anti-PD-L1. A imunização com ovalbumina mais o Diprovocim ou ovalbumina mais o inibidor anti-PD-L1, apresentou algum benefício, mas 100% dos camundongos responderam à imunização com os três componentes: Diprovocim, imunógeno e inibidor do ponto de controle. Os dados sugerem que o Diprovocim-1 aumenta o sucesso do tratamento com anti-PD-L1

aumentando-se o número e a ativação de CTLs específicos do tumor capazes de responder a este inibidor do ponto de controle.

[0014] Conforme revelado no documento nº WO 2018/005812 e Morin et al., J Am Chem Soc, In Press (2018), vários membros da família Diprovocim foram preparados, sua atividade testada, e foram dados números, como, Diprovocim-1 a Diprovocim-6. Vários outros compostos da família Diprovocim que têm perfis de atividade semelhantes, semelhantes aos valores de atividade um pouco menores nos testes usados, também foram preparados e testados.

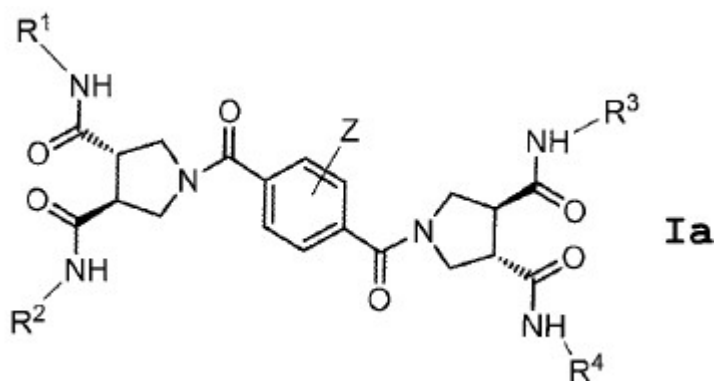
[0015] O Diprovocim-1 foi usado no presente documento como um membro exemplar da família toda, e é para ser entendido a seguir significar que um membro da família Diprovocim é usado quando a palavra Diprovocim é usada sem um numeral hifenizado adicionado. Assim, quando usado em conexão com as palavras "família" ou "uma" conforme na "família Diprovocim" ou "um Diprovocim", a palavra "Diprovocim" é usada para significar um membro da família Diprovocim conforme definido pela Fórmula V. A palavra "Diprovocim" usada com a palavra "preferida" refere-se a um composto da Fórmula I, e a frase "mais preferido" ou "mais preferivelmente" refere-se a um composto da família Diprovocim da Fórmula Ia. Um Diprovocim "mais preferido" é um dos compostos com letras de A-I observados abaixo.

[0016] Um membro preferido da família Diprovocim dos compostos é um composto que corresponde na estrutura à Fórmula estrutural I, abaixo,



em que -A -C(O)NH-R⁴. O R¹⁻⁴ representado, as porções W e Z são como descritas acima.

[0017] Um membro ainda mais preferido da família Diprovocim dos compostos é um composto que corresponde na estrutura à Fórmula estrutural Ia, abaixo,



[0018] Fórmulas estruturais dos compostos atualmente mais preferidos da Fórmula Ia em que R^{1-4} são como definido previamente, e -Z é hidrídico (-H) são mostrados a seguir como compostos das Fórmulas A, B, C, D, E, F, G, H, e I.

[0019] Um Diprovocim é utilizado em uma quantidade suficiente de adjuvante para contatar as células do mamífero hospedeiro que expressam uma molécula marcadora relacionada à doença antigênica.

[0020] As células do mamífero hospedeiro que expressam um composto marcador relacionado à doença antigênica, como, uma sequência de peptídeo também são postas em contato com uma quantidade estimuladora de resposta imune de um inibidor do ponto de controle, preferivelmente um anticorpo ou porção de anticorpos contendo parátomos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0021] Nos desenhos que formam uma porção desta revelação.

[0022] A Figura 1A até a Figura 1F fornecer uma série de gráficos que ilustram que o Diprovocim induz a secreção de citocinas pelas células humanas e de camundongo. A Figura 1A a 1D ilustra as quantidades de TNF nos sobrenadantes das células THP-1 humanas (Figura 1A), PBMC humano (Figura 1B), macrófagos peritoneais de camundongo (Figura 1C), ou PBMC de camundongo (Figura 1D) após tratamento com Diprovocim-1 durante 4 horas (Figura 1A, Figuras 1C a 1D) ou 24 horas (Figura 1B). A Figura 1E ilustra as quantidades de IL-6 nos sobrenadantes de

PBMC de camundongo após tratamento com Diprovocim durante 4 horas. Em cada uma da Figura 1A a 1E, as médias de três amostras independentes são plotadas; os valores de P foram determinados por ANOVA unidirecional para comparar as respostas a diferentes doses; em todos os estudos $P < 0,0001$. Os resultados nas Figura 1A a Figura 1E são representativos de dois estudos independentes.

[0023] Figura 2A a Figura 2D ilustram que um Diprovocim ativa TLR1/TLR2 humano e de camundongo. A Figura 2A é um gráfico que mostra a quantidade de TNF nos sobrenadantes de macrófagos peritoneais de camundongo dos genótipos indicados após tratamento com Diprovocim (500 nM) durante 4 horas ($n = 3$ camundongos por genótipo). Os níveis de citocina foram normalizados para essas das células C57BL/6J estimuladas. Os valores de P foram determinados pelo teste t de Student e representam a significância das diferenças entre as respostas das células C57BL/6J estimuladas e as células estimuladas dos genótipos mutantes; quatro estrelas indicam aquelas com diferenças significativas estatisticamente. A Figura 2B é um gráfico que mostra a quantidade de TNF nos sobrenadantes de células THP-1 humanas pré-tratadas com anticorpo de controle, anti-TLR1 (20 µg/ml), ou anti-TLR2 (20 µg/ml) durante 1 hora, seguido por tratamento com veículo ou Diprovocim (250 pM) durante outras 4 horas. Os valores de P foram determinados pelo teste t de Student. Na Figura 2A e Figura 2B as médias de três amostras independentes são plotadas. A Figura 2C e Figura 2D são imunomanchamentos que mostram os resultados da análise dos lisados das células THP-1 humanas (Figura 2C) e os macrófagos peritoneais de camundongo (Figura 2D) tratados com Diprovocim (5 nM em THP-1 e 500 nM em macrófagos peritoneais de camundongo) durante os tempos indicados. Todos os resultados são representativos de dois estudos independentes.

[0024] A Figura 3A a Figura 3G ilustram através de gráficos e esquemas que o Diprovocim aumenta anticorpo específico para antígeno e respostas na CTL. A Figura 3A a Figura 3C que mostram os resultados camundongos C57BL/6J WT ou $Tlr2^{-/-}$ (4 camundongos por grupo) foram imunizados intramuscularmente com 100 µg de OVA misturado com veículo, Diprovocim (10 mg/kg), ou alume (2 mg/kg). Após 14 dias, os títulos de soro de IgG específica da OVA (Figura 3A), IgG específica da OVA1 (Figura

3B) e IgG2b específica da OVA (Figura 3C) foram medidos por ELISA. A Figura 3D que mostram um esquemático da configuração experimental (esquerda) e os resultados para detecção (centro) e quantificação (direita) da expressão CD69 nas células T OT-I CD8 por citometria de fluxo após 24 horas de cocultura com DC coletadas dos camundongos 24 horas após serem imunizados intramuscularmente com OVA misturada com veículo ou Diprovocim (4 camundongos por grupo).

[0025] A Figura 3E e Figura 3F que mostram os resultados de camundongos que não foram imunizados ou imunizados intramuscularmente com 100 µg de OVA misturado com veículo ou Diprovocim (10 mg/kg) (4 camundongos por grupo). Sete dias após a imunização, os camundongos foram injetados intravenosamente com esplenócitos de camundongo marcados com Celltrace Violet que não foram pulsados (células de controle) ou pulsados com OVA peptídeo (a.a. 257 a 263) (células alvo). Dois dias depois, o sangue foi coletado para medir a células restantes marcadas com corante vivo. A Figura 3E ilustra plotagens da citometria de fluxo representativas que contam as células alvo restantes (pico direito) e células de controle (pico esquerdo) em camundongos tipo selvagem. A Figura 3F que mostra uma comparação quantitativa da porcentagem das células alvo mortas em camundongos WT, Tlr1^{1/1} ou Tlr2^{1/1}. Os valores de P foram determinados pelo teste t de Student. Todos os resultados são representativos de dois estudos independentes.

[0026] A Figura 4A a Figura 4J ilustram a inibição do desenvolvimento do tumor B16-OVA pelo tratamento pré ou pós-tumor com vacinação tumoral com adjuvada com Diprovocim e bloqueio do ponto de controle. A Figura 4A fornece um esquemático de protocolos de tratamento pré e pós-tumor. Os camundongos C57BL/6J (n=8 camundongos por tratamento) foram injetados subcutaneamente com 2x10⁵ de células do melanoma B16-OVA no dia 0. Para tratamento pré-tumor, os camundongos foram imunizados intramuscularmente com OVA (100 µg) misturada com veículo ou Diprovocim (10 mg/kg) ou alume (2 mg/kg) no mesmo dia antes da injeção do tumor. Os camundongos receberam uma imunização de reforço sete dias depois em que anti-PD-L1 (200 µg) foi administrado nos dias 3, 6 e 9 após inoculação do tumor por injeção intraperitoneal. Para o tratamento pós-tumor, a imunização inicial foi no dia 3 após

inoculação do tumor, com um reforço sete dias depois. Anti-PD-L1 (200 µg) foi administrado nos dias 3, 6, 9, 12, e 15 após inoculação do tumor por injeção intraperitoneal. A Figura 4B a Figura 4F ilustram os resultados do tratamento pré-tumor. O volume do tumor (Figura 4B e Figura 4D) e porcentagem de sobrevivência do camundongo (sobreviventes/camundongos totais) (Figura 4C e Figura 4E). A Figura 4F que mostra camundongos infantis (n = 8) ou dia 35 sobreviventes livres de tumor (n = 8) de (Figura 4C) foram desafiados com 2×10^5 células cada uma das células tumorais B16-OVA e B16F10 por injeção subcutânea, e o volume do tumor foi monitorado. A Figura 4G a Figura 4J ilustram a comparação do tratamento pré-tumor (Figura 4G e Figura 4H) vs. pós-tumor (Figura 4I e Figura 4J). O volume do tumor (Figura 4G e Figura 4I) e a porcentagem de sobrevivência do camundongo (sobreviventes/camundongos totais) (Figura 4H e Figura 4J) são mostrados. Os valores de P para análise do volume do tumor se aplicam ao ponto de tempo final conforme indicado nos gráficos e foram calculados pelo teste t de Student. Os valores de P para análise de sobrevivência foram calculados por análise de Kaplan-Meier. Todos os resultados são representativos de dois estudos independentes.

[0027] A Figura 5A a Figura 5M ilustram que um Diprovocim aumenta os TILs e respostas de CTL antitumor. A Figura 5A é um esquemático de protocolo de tratamento para Figura 5A a Figura 5J em que os camundongos C57BL/6J (n=6 camundongos por tratamento) foram injetados subcutaneamente com 2×10^5 células do melanoma B16-OVA no dia 0 e três dias depois, imunizados intramuscularmente com OVA (100 µg) misturada com veículo ou Diprovocim (10 mg/kg) ou alume (2 mg/kg). Os camundongos receberam uma imunização de reforço no dia 10 após inoculação do tumor em que anti-PD-L1 (200 µg) foi administrado nos dias 3, 6, 9, e 12 após inoculação do tumor por injeção intraperitoneal. Os tumores foram colhidos no dia 14 para isolar e analisar leucócitos infiltrantes tumorais (TILs). A Figura 5A a Figura 5J ilustram a frequência de cada tipo de célula das células tumorais totais é mostrada. A Figura 5B que mostra TILs (CD45⁺). A Figura 5C que mostra as células T CD4 (CD4⁺CD3⁺CD45⁺). A Figura 5D que mostra células T CD4 ativadas (CD44^{elevado}CD4⁺CD3⁺CD45⁺). A Figura 5E que mostra as células T CD8

(CD8⁺CD3⁺CD45⁺). A Figura 5F que mostra as células T CD8 ativadas (CD44^{elevado}CD8⁺CD3⁺CD45⁺). A Figura 5G que mostra as células T CD8 específicas da OVA transportando um receptor de célula T específico para tetrâmero OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎-H2Kb. A Figura 5H que mostra as células NK (NK1.1⁺CD3⁻CD45⁺). A Figura 5I que mostra as DCs (CD11c⁺CD3⁻CD45⁺). A Figura 5J que mostra os macrófagos (F4/80⁺CD11b⁺CD45⁺).

[0028] A Figura 5K é um esquemático de tratamento de um protocolo para a Figura 5L e Figura 5M em que os camundongos C57BL/6J (n=8 camundongos por tratamento) foram injetados subcutaneamente com 2×10^5 de células do melanoma B16-OVA no dia 0 e três dias depois imunizados intramuscularmente com OVA (100 µg) misturada com veículo ou Diprovocim (10 mg/kg). Os camundongos receberam uma imunização de reforço no dia 10 após inoculação do tumor em que anti-PD-L1 (200 µg) foi administrado no dia 3, 6, 9, 12, e 15 após inoculação do tumor por injeção intraperitoneal. No 0, 3, 6, 9, 12, e 15, anti-CD4 (300 µg), anti-CD8 (300 µg), anti-NK1.1 (300 µg), ou uma mistura destes três anticorpos foi administrada aos camundongos C57BL/6J por injeção intraperitoneal. O volume do tumor (Figura 5L) e a porcentagem de sobrevivência do camundongo (sobreviventes/camundongos totais) (Figura 5M) são ilustrados. Os valores de P para análise do volume do tumor se aplicam ao ponto de tempo final conforme indicado nos gráficos e foram calculados pelo teste t de Student. Os valores de P para análise de sobrevivência foram calculados por análise de Kaplan-Meier. Todos os resultados são representativos de dois estudos independentes.

[0029] A Figura 6 que mostra um modelo esquemático dos principais eventos celulares que mediam o efeito antitumor da imunização adjuvante com Diprovocim mais inibição do ponto de controle.

[0030] A Figura 7 ilustra que um Diprovocim não estimula a secreção de IFN-β pelos macrófagos peritoneais de camundongo. O IFN-β nos sobrenadantes dos macrófagos peritoneais de camundongo após tratamento com Diprovocim ou LPS durante 4 horas foi testado. As médias de três amostras independentes são plotadas. Os valores de P foram determinados pelo teste t de Student; não foram encontradas

diferenças significativas entre as respostas das células não estimuladas (0 nM) e as células estimuladas com Diprovocim. Os resultados são representativos de dois estudos independentes.

[0031] A Figura 8A e Figura 8B ilustram que os anticorpos anti-PD-L1 não inibem o desenvolvimento do tumor B16 nos camundongos. Os camundongos C57BL/6J (n=8) foram injetados subcutaneamente com 2×10^5 de células do melanoma B16-OVA no dia 0. Anti-PD-L1 (200 μ g) ou anticorpo de controle de isótipo IgG2a de camundongo foi administrado nos dias 3, 6 e 9 após inoculação do tumor por injeção intraperitoneal. A Figura 8A é um gráfico do volume do tumor versus o tempo e a Figura 8B é um gráfico que mostra a porcentagem da sobrevivência do camundongo (sobreviventes/camundongos totais) versus o tempo. Os valores de controle e ambas as plotagens são mostrados acima daqueles para os valores de anti-PD-L1 onde os dois valores divergem. O valor de P para análise do volume do tumor aplica-se ao ponto de tempo final e foi calculado pelo teste t de Student; nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os tratamentos. Os valores de P para análise de sobrevivência foram calculados por análise de Kaplan-Meier; nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os tratamentos. Os resultados são representativos de dois estudos independentes.

[0032] A Figura 9A e Figura 9B ilustram que um Diprovocim é mais potente do que Pam₃CSK₄ na ativação da produção de TNF nas células humanas. A Figura 9A e Figura 9B que mostram as quantidades de TNF testada dos sobrenadantes das células THP-1 humanas (Figura 9A) e PBMC humano (Figura 9B) após tratamento com Diprovocim ou Pam₃CSK₄ durante 4 horas (Figura 9A) ou 24 horas (Figura 9B). Os pontos de dados para o Diprovocim são mostrados de modo geral à esquerda dos pontos de dados para Pam₃CSK₄ na Figura 9A, acima dos pontos de dados para Pam₃CSK₄ onde as linhas divergem na Figura 9B. As médias de três amostras independentes são plotadas. Os resultados são representativos de dois estudos independentes.

DEFINIÇÕES

[0033] Anticorpo: um polipeptídeo que imunologicamente se liga à um grupo

ligante. Os anticorpos, conforme usados no presente documento, são moléculas de imunoglobulina e fragmentos ativos imunologicamente de moléculas de imunoglobulina. Tais porções conhecidas na técnica como Fab, Fab'; F(ab')₂ e F_v são incluídas. Tipicamente, os anticorpos ligam os ligantes que variam no tamanho de cerca de 6 a cerca de 34 Ångstroms (Å) com constantes de associação na faixa de cerca de 10⁴ a cerca de 10¹⁰ M⁻¹, e tão elevada quanto 10¹³ M⁻¹. Os anticorpos podem ligar uma ampla faixa de ligantes, que incluem moléculas pequenas, como, esteroides e prostaglandinas, biopolímeros, como, ácidos nucleicos, proteínas e polissacarídeos, e polímeros sintéticos, como, polipropileno.

[0034] Um "local de combinação de anticorpo" ou "parátopo" é aquela porção estrutural de uma molécula de anticorpo compreendida de uma variável de cadeia pesada e leve e regiões hipervariáveis que especificamente se ligam a (imunoreagem com) um "antígeno" ou "epítopo".

[0035] O termo "anticorpo" é pretendido para particularmente abranger anticorpos monoclonais que são adequados para injeção (farmaceuticamente aceitável) em um mamífero doente com necessidade de tratamento sem desfazer efeitos adversos devido aos contaminantes. Tais anticorpos monoclonais podem ser obtidos a partir da espécie animal que é imunizada conforme discutido no presente documento, como, um ser humano. Ou, os anticorpos podem ser induzidos em um animal e o células produtoras de anticorpos modificadas para produzir sequências de proteína do anticorpo do mamífero a ser imunizado. Embora outras espécies de mamífero sejam contempladas para imunização, um ser humano é um recipiente particularmente preferido da imunização. Como consequência, um anticorpo monoclonal contemplado que foi originalmente induzido em um camundongo, por exemplo, pode ser mais útil para um receptor humano como um anticorpo denominado "humanizado", ou como um anticorpo "quimérico". Estes termos são usados no presente documento como descrito em International Nonproprietary Names (INN) for biological and biotechnological substances (a review), World Health Organization (2016), §2.7.

[0036] A palavra "antígeno" foi usada historicamente para designar uma entidade que é ligada por um anticorpo ou receptor, e também para designar a entidade que

induz a produção do anticorpo. O uso mais atual limita o significado de antígeno àquela entidade ligada por um anticorpo ou receptor, visto que a palavra "imunógeno" é usada para a entidade que induz a produção de anticorpo ou se liga ao receptor. Quando uma entidade discutida no presente documento é ambos imunogênica e antigênica, referência a ela ou como um imunógeno ou antígeno é tipicamente realizada de acordo com sua utilidade pretendida.

[0037] O termo "imunorreagir" em suas várias formas é usado no presente documento para se referir à ligação específica entre uma molécula contendo um determinante antigênico (antígeno) e uma molécula contendo um local de combinação de anticorpo, como, uma molécula de anticorpo inteira ou uma porção da mesma contendo parátomos.

[0038] Um "determinante antigênico" é a porção estrutural do antígeno que é imunologicamente ligada por um local de combinação de anticorpo ou receptor de célula T. O termo também é usado alternadamente com "epítipo". Os anticorpos podem se ligar à um epítipo único de um antígeno (monoclonal) ou múltiplos epítipos (policlonais). Em um material proteináceo, o comprimento de um epítipo linear é geralmente mencionado como sendo de cerca de 5 a cerca de 7 resíduos de aminoácidos.

[0039] Os artigos "um" e "uma" são usados no presente documento para se referir à um ou a mais do que um (isto é, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais do que um elemento.

[0040] A palavra "hidrocarbila" é usada no presente documento como um termo abreviado para um grupo não aromático que inclui grupos alifáticos de cadeia ramificada e linear, bem como, alicíclicos ou radicais que contêm apenas carbono e hidrogênio. Assim, os grupos de alquila, alquenila e alquinila são contemplados, visto que os hidrocarbonetos aromáticos, como, grupos de fenila e naftila, que rigorosamente falando também são grupos de hidrocarbila, são denominado no presente documento como radicais ou grupos de arila, conforme discutido a seguir.

[0041] Quando um grupo de substituinte de hidrocarbila alifática específico é pretendido, esse grupo é mencionado; isto é, metila, etila, butila, terc-butila, hexila,

hexenila, 2-etilhexila, dodecila (C₁₂), octadecila (C₁₈). Um grupo de hidrocarbila particularmente preferido é em grupo de alquila. Como consequência, um substituinte generalizado, mas mais preferido pode ser mencionado por substituição do descritor "hidrocarbila" por "alquila" em qualquer um dos grupos substituintes enumerados no presente documento.

[0042] Embora grupos de hidrocarbila de cadeia longa (por exemplo, C₁₈) sejam contemplados, os exemplos de grupos mais curtos (C₁-C₄) são usados ilustrativamente aqui. Tais radicais ilustrativos de alquila incluem etila, n-propila, isopropila, n-butila, isobutila, sec-butila, terc-butila e ciclopropila. Os exemplos de radicais adequados de alquenila incluem etenila (vinila), 2-propenila, 3-propenila, 1,4-butadienila, 1-butenila, 2-butenila, e 3-butenila. Os exemplos de radicais de alquinila incluem etinila, 2-propinila, 1-propinila, 1-butinila, 2-butinila, 3-butinila, e 1-metil-2-propinila.

[0043] Como um trabalhador versado entenderá, um substituinte que pode não existir, como, grupo de alquenila C₁ não é pretendido estar abrangido pela palavra "hidrocarbila", embora tais substituintes com dois ou mais átomos de carbono sejam pretendidos.

[0044] A nomenclatura de sufixo químico usual é seguida quando usando a palavra "hidrocarbila" exceto que a prática usual de remoção do terminal "ila" e adicionando um sufixo apropriado não é sempre seguido por causa da possível similaridade de um nome resultante para um ou mais substituintes. Assim, um éter de hidrocarbila é denominado um grupo de "hidrocarbiloxi" em vez de um grupo de "hidrocarbóxi" como pode possivelmente ser mais apropriado quando seguindo as regras usuais de nomenclatura química. Os grupos ilustrativos de hidrocarbiloxi incluem grupos de metóxi, etóxi, n-propóxi, isopropóxi, alilóxi, n-butóxi, iso-butóxi, sec-butóxi, e terc-butóxi.

[0045] Ligante: uma molécula que tem uma região estrutural que se liga especificamente a uma molécula receptora particular, geralmente por meio de forças eletrostáticas e/ou ligações de hidrogênio. Um ligante exemplar é a molécula de fator de crescimento epidérmico.

[0046] A "molécula marcadora" (antígeno ou imunógeno) pode ser, mas necessita ser expressa na superfície celular, e de preferência pode ser expressa em qualquer parte na célula doente. A razão para isso é que substancialmente todas as proteínas celulares nativas de mamíferos são processadas em peptídeos mais curtos pela célula e ligadas extracelularmente pelas moléculas de MHC de classe I. Tais proteínas nativas são tipicamente assim processadas durante a imaturidade do organismo, e as células T ou outras células imunes que podem ser induzidas por essas porções de proteína nativa são eliminadas pelo organismo antes de maturidade, resultando em tolerância à "autoproteína". Como resultado, exceto nos casos de certas doenças imunológicas, apenas peptídeos estranhos ou peptídeos neoantigênicos causados pela doença, como, câncer cujas células resultam de mutação são reconhecidas como "estranhas" e induzem uma resposta imune ao peptídeo ligado ao MHC.

[0047] Além disso, quanto às mutações, às vezes a mutação pode ser uma mutação da fase de leitura, e uma sequência não natural dos resultados de aminoácidos. A molécula marcadora também pode ser um "antígeno tumoral;" que é, uma proteína que pode ser expressa por outras células durante o desenvolvimento embrionário, por exemplo, mas é caracteristicamente expressa muito mais pelos tumores do que pelas células normais. Ou a molécula marcadora pode ser um produto oncogene, por exemplo, uma proteína de fusão anormal criada por um evento de recombinação dentro das células tumorais. A molécula marcadora também pode ser o produto de um agente infeccioso, como, um vírus ou bactéria também.

[0048] Peptídeo/Polipeptídeo: um oligômero ou polímero que compreende pelo menos dois resíduos de aminoácidos em que resíduos adjacentes estão ligados por uma ligação de peptídeo entre o grupo de alfa-amino de um resíduo e o grupo de alfa-carboxila de um resíduo adjacente. A estrutura primária de um polipeptídeo tem um grupo de amina primária em um terminal e um grupo de ácido carboxílico em outro terminal do polímero. Um peptídeo ou polipeptídeo é representado no presente documento e geralmente na técnica da esquerda para a direita e na direção do terminal de amino para o terminal de carbóxi. Além disso, um polipeptídeo em solução aquosa está geralmente em um ou mais formas híbridas dependendo do pH da

solução. As palavras "peptídeo" e "polipeptídeo" são usadas alternadamente no presente documento.

[0049] Proteína: um polipeptídeo único ou conjunto de polipeptídeos reticulados que compreende mais do que cerca de 100 resíduos de aminoácidos. As proteínas podem ter reticulação química, por exemplo, por meio de pontes de dissulfeto, dentro da mesma cadeia de polipeptídeo ou entre os polipeptídeos adjacente. Quando uma proteína é glicosilada pode ser chamada uma glicoproteína. Quando uma proteína compreende uma ou mais subunidades discretas de polipeptídeo/proteína ligadas entre si, como por uma ligação de peptídeo, sequência de resíduo de aminoácidos, ponte de dissulfeto, e outros mais, a proteína é frequentemente chamada uma proteína de fusão, polipeptídeo de fusão, fusão quimérica, e outros mais.

[0050] Receptor: uma molécula proteínácea biologicamente ativa que tem uma região estrutural que especificamente se liga a (ou com) outra molécula (ligante). Uma molécula receptora exemplar é um local de combinação de anticorpo ou uma molécula de proteína celular de transmembrana envolvida na sinalização intra- ou intercelular, como, o receptor de hormônio do crescimento endotelial denominado EGFR, ERBB e, além disso, como HER2, e outros mais.

[0051] O termo "resíduo" é usado alternadamente com a frase resíduo de aminoácidos. Todos os resíduos de aminoácidos identificados no presente documento estão na configuração L ou natural. De acordo com a nomenclatura padrão de polipeptídeo, [J. Biol. Chem., 243:3557 a 59 (1969)], as abreviações para os resíduos de aminoácidos são como mostrado na seguinte Tabela de Correspondência.

TABELA DE CORRESPONDÊNCIA

1 Letra	3 Letras	NOME DO AMINOÁCIDO
Y	T'vr'	L-tirosina
G	Gly	glicina
F	Phe	L-fenilalanina
M	Met	L-metionina
A	Ala	L-alanina
S	Ser	L-serina

I	Ile	L-isoleucina
L	Leu	L-leucina
T	Thr	L-treonina
\T	Val	L-valina
P	Pro	L-prolina
K	Lys	L-lisina
H	His	L-histidina
Q	Gln	L-glutamina
E	Glu	L-ácido glutâmico
Z	Glx	L-ácido glutâmico ou L-glutamina
W	Trp	L-triptofano
R	Arg	L-arginina
D	Asp	L-ácido aspártico

[0052] A presente invenção tem vários benefícios e vantagens.

[0053] Um benefício saliente da invenção é que a imunização por combinação fornece resultados sinérgicos na combinação do desenvolvimento de células doentes.

[0054] Uma vantagem da invenção é que a imunização por combinação fornece ajuda de célula T que as vacinas livres de bactérias e vírus muitas vezes não têm.

[0055] Outro benefício que a invenção fornece é que aqueles versados na técnica têm encontrado, estudado e publicado fórmulas de imunógenos relacionados à doença que não tiveram sucesso desde o início dos anos 1980, mas agora podem ser de forma bem sucedida colocadas em uso.

[0056] Ainda outros benefícios e vantagens da invenção serão evidentes para o trabalhador versado a partir das revelações que seguem.

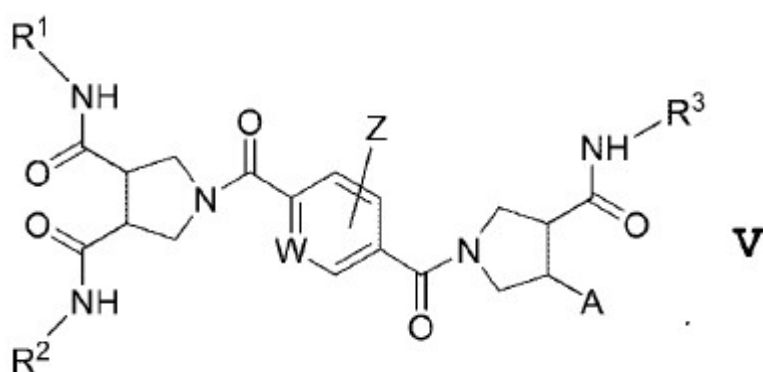
DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES PREFERIDAS

[0057] A presente invenção contempla um método para inibir o desenvolvimento de células doentes em um mamífero. Essas células doentes expressam uma ou mais moléculas marcadoras que estão ausentes nas células do mesmo tipo que estão livres da doença ou estão presentes nas células livres da doença em números reduzidos

significativamente comparado às células doentes. Os trabalhadores versados na técnica publicaram numerosos artigos e revisões discutindo as moléculas marcadoras que estão presentes nas células doentes em quantidades significativamente maiores do que a quantidade presente nas células livres da doença e métodos para determinar essas diferenças. Consultar, por exemplo, Kim et al., BMB Rep 50(6):285 a 298 (2017) e citações na mesma. Além disso, as técnicas, como, manchas do Oeste quantitativas realizadas com varreduras de densidade óptica ou meios de detecção de radioatividade e outros meios são bem conhecidos na técnica. As células "do mesmo tipo" são células livres da doença do mesmo órgão e tecido conforme as células doentes.

[0058] Um método contemplado compreende as etapas de imunização de um mamífero doente com necessidade de: a) administrar ao mamífero doente (i) uma quantidade suficiente de adjuvante de um composto de Diprovocim, (ii) uma quantidade estimuladora de célula T de um inibidor do ponto de controle imunológico, e (iii) uma quantidade imunizante daquela molécula marcadora. O mamífero imunizado é b) mantido durante um período de tempo suficiente para o mamífero montar uma resposta imune à imunização e inibir o desenvolvimento de células doentes.

[0059] Um composto de Diprovocim contemplado corresponde na estrutura à Fórmula estrutural V,



em que

-A é -H (hidrido) ou -C(O)NH-R⁴;

R^1 , R^2 , R^3 e R^4 são os mesmos ou diferentes e são uma 2-(4-fluorofenil)etila, uma trans-2-fenilciclopropila, uma trans-2-(4-fluorofenil)-ciclopropila ou um grupo de hidrocarbila C_2-C_{18} com as condições de que:

1) pelo menos dois de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 (R^{1-4}) ou pelo menos dois de R^1 , R^2 , e R^3 (R^{1-3}) são uma trans-2-fenilciclopropila, um grupo de trans-2-(4-fluorofenil)-ciclopropila ou uma mistura dos mesmos, ou cada um de R^{1-4} é um grupo de 2-(4-fluorofenil)etila,

2) pelo menos um grupo de pirrolidinildicarboxamido representado tem a configuração (S, S), e cada substituinte de R representado diferente de um grupo de hidrocarbila C_2-C_{18} é uma trans-2-fenilciclopropila, um grupo de trans-2-(4-fluorofenil)-ciclopropila ou uma mistura dos mesmos quando cada um de R^{1-4} é diferente de 2-(4-fluorofenil)etila,

3) não mais do que dois de R^{1-4} são grupos de hidrocarbila C_2-C_{18} quando -A é -C(O)NH- R^4 , e

4) quando A é hidrido, um de R^{1-3} pode ser um grupo de hidrocarbila C_2-C_{18} e o grupo de pirrolidinilcarboxamido contendo R^{3-} representado pode ter ou as configurações R ou S, ou uma mistura de ambas configurações;

-Z é um ou mais de halogênio -H, -NH₂, -OH, -OCH₃, -NO₂, -OCH₂CO₂H, -O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONH(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -NHCOCH₂O-(CH₂CH₂O)_nCH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCHCO₂H(CH₂CO₂H), -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH[(CH₂)₄NH₂]CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CH₂OH)CO{NHCH[(CH₂)₄NH₂]CO}_mNHCH-[(CH₂)₄NH₂]CO₂H (SEQ ID NOS: 3 a 8), -OCH₂CONHCH₂CO{NHCH[(CH₂)₄NH₂]CO}_pNHCH[(CH₂)₄NH]CO₂H (SEQ ID NOS: 9 a 13) e -OCH₂CONHCH₂CO{NHCH(CH₂OH)CO}_qNHCH(CH₂OH)CO₂H (SEQ ID NOS: 14 a 18);

W é nitrogênio (N) ou CH;

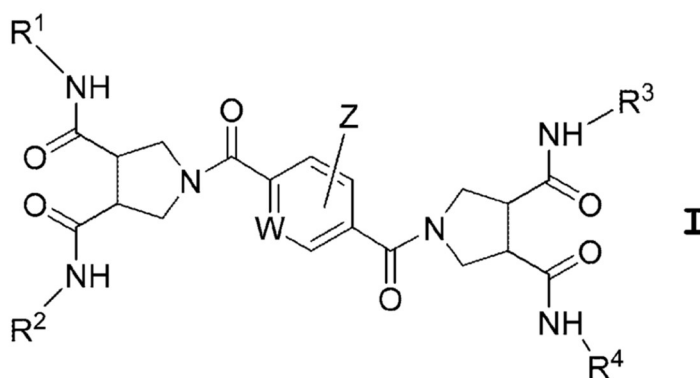
"n" é um número cujo valor médio é um em torno de oito;

"m" é um número cujo valor é de 1 a cerca de 6;

"p" é um número cujo valor é de 1 a cerca de 6; e

"q" é um número cujo valor é de 1 a cerca de 6.

[0060] Um membro preferido da família Diprovocim de compostos da Fórmula V é um composto que corresponde na estrutura à Fórmula estrutural I, abaixo, em que -A = -C(O)NH-R⁴, e o R¹⁻⁴ representado,



as porções W e Z são descritas acima.

[0061] Em um composto mais preferido da Fórmula I, pelo menos um membro de par substituinte R¹ e R³ (ou R¹ ou R³) ou par R¹ e R² (ou R¹ ou R²) é uma trans-2-fenilciclopropila ou grupo de trans-2-(4-fluorofenil)ciclopropila. É, além disso, preferido que pelo menos um membro de par de substituinte R¹ e R³ o par de R¹ e R² tem a configuração (1S,2R) de uma trans-2-fenilciclopropila ou grupo de trans-2-(4-fluorofenil)ciclopropila.

[0062] Mais preferencialmente, pelo menos três substituintes de R¹, R², R³ e R⁴ têm a configuração (1S, 2R) de um grupo trans-2-fenilciclopropila ou trans-2-(4-fluorofenil)ciclopropila. Mais preferencialmente ainda, cada um dentre R¹, R², R³ e R⁴ tem a configuração (1S, 2R) de um grupo trans-2-fenilciclopropila ou um trans-2-(4-fluorofenil)ciclopropila.

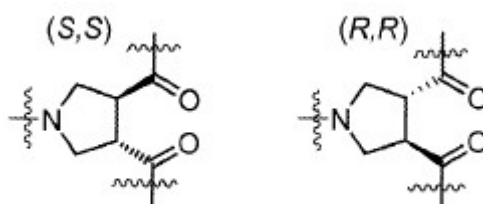
[0063] Em outra preferência, cada grupo piperidinildicarboxamido retratado tem a configuração (S,S) e cada substituinte R¹⁻⁴ retratado é um grupo trans-2-fenilciclopropila, um trans-2-(4-fluorofenil)ciclopropila ou uma mistura dos mesmos, e

se liga à porção química de ciclopropila têm uma configuração (1S,2R).

[0064] Em outro aspecto, até dois de R^{1-4} em um composto de Fórmula I ou uma de suas fórmulas subgenéricas podem ser um grupo C_2-C_{18} hidrocarbila. É preferencial que o grupo hidrocarbila seja um grupo alquila e têm um comprimento de 4 a cerca de 16 átomos de carbono, e mais preferencialmente ainda, cerca de 6 a cerca de 10 átomos de carbono. Grupos de hidrocarbila de cadeia linear são também preferidos, embora até dois substituintes de grupo metila e etila ou ambos podem estar presentes conforme podem um anel carbocíclico, e também uma ou duas ligações duplas ou triplas. Grupos C_2-C_{18} hidrocarbila específicos são discutidos anteriormente na discussão do uso da palavra hidrocarbila.

[0065] Conforme é visto a partir da Fórmula I, cada molécula contém pelo menos um, e preferencialmente dois, grupos 3,4-pirrolidinildicarboxila. Os grupos carboxila são ligados a substituintes R^1 , R^2 , R^3 e R^4 terminados em amina, formando quatro (ou três) ligações de amido. Os dois grupos pirrolidinildicarboxila também podem ser, portanto, denominados como dois grupos pirrolidinildicarboxamido.

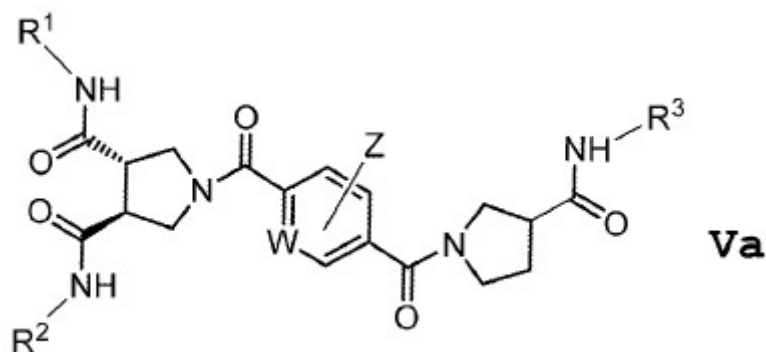
[0066] Substituintes ligados aos grupos carboxila de um grupo pirrolidinildicarboxila pode ser em uma conformação cis ou trans, que é, ambos os dois substituintes podem projetar acima ou abaixo do plano do anel retratado (cis), ou um pode projetar acima do plano e o outro projeto substituinte abaixo (trans). Um grupo pirrolidinildicarboxila cis substituído com dois substituintes idênticos tem uma configuração simétrica e não tem formas enantioméricas. Um grupo pirrolidinildicarboxila trans-dissubstituído por aqueles mesmos dois substituintes idênticos tem uma configuração assimétrica (quiral) e tem formas enantioméricas. As duas configurações quirais são denominadas como (S,S) e (R,R), e são mostradas abaixo.



[0067] É preferencial que pelo menos um, e mais preferencialmente ambos 3,4-

grupos pirrolidinildicarboxila tenham a configuração (S,S).

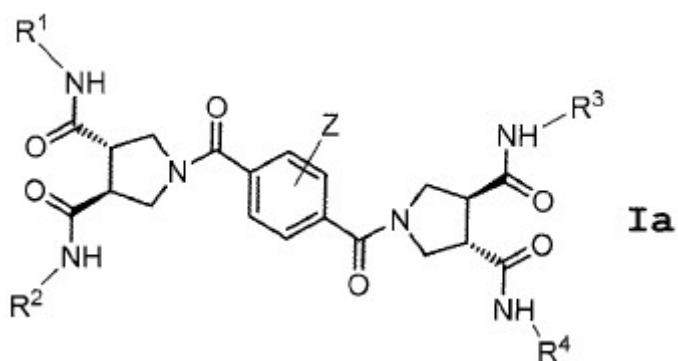
[0068] Por outro lado, quando -A de Fórmula V é hídrico e um dentre r^{1-3} é um grupo C₂-C₁₈ hidrocarbila, e mais preferencialmente, um grupo C₁₀-C₁₆ hidrocarbila. Um grupo preferido corresponde em estrutura à Formula Va, abaixo, no qual o R¹⁻³ retratado, porções químicas W



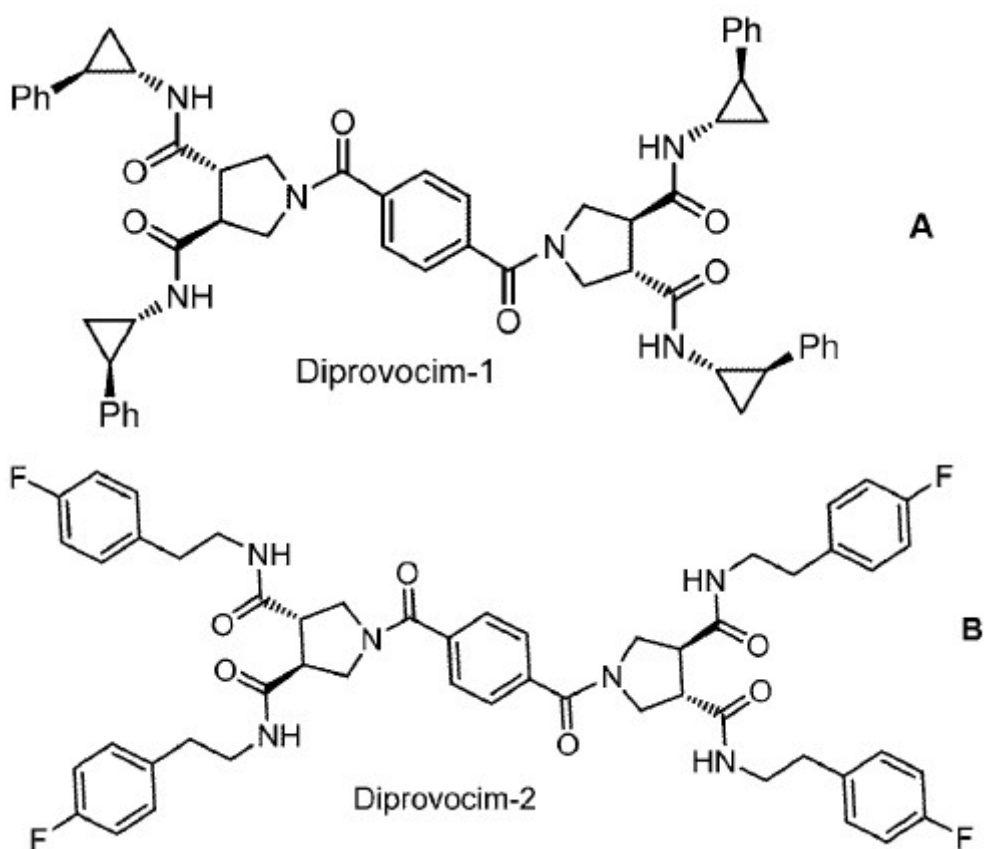
e Z são conforme descrito acima. O grupo -C(O)NH-R₃ retratado pode estar tanto na configuração R, na configuração S ou como presente como uma mistura de ambas as configurações. Os compostos com a configuração S são ligeiramente mais ativos e, portanto, mais preferidos.

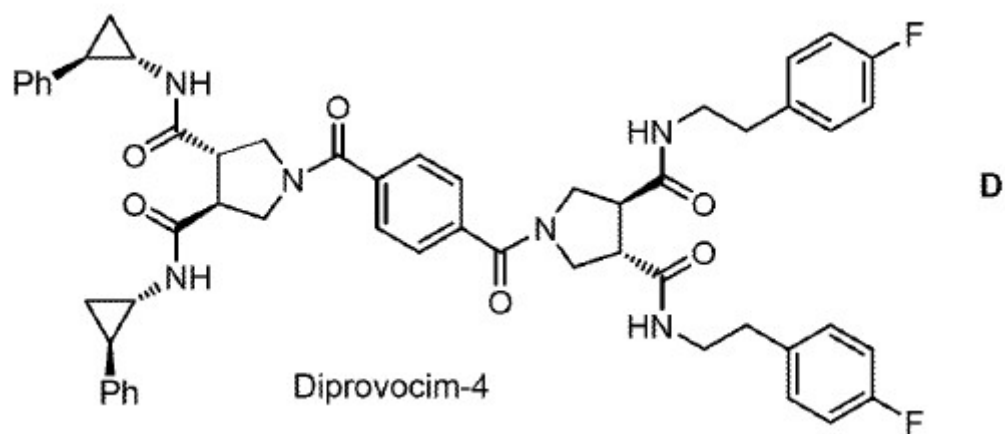
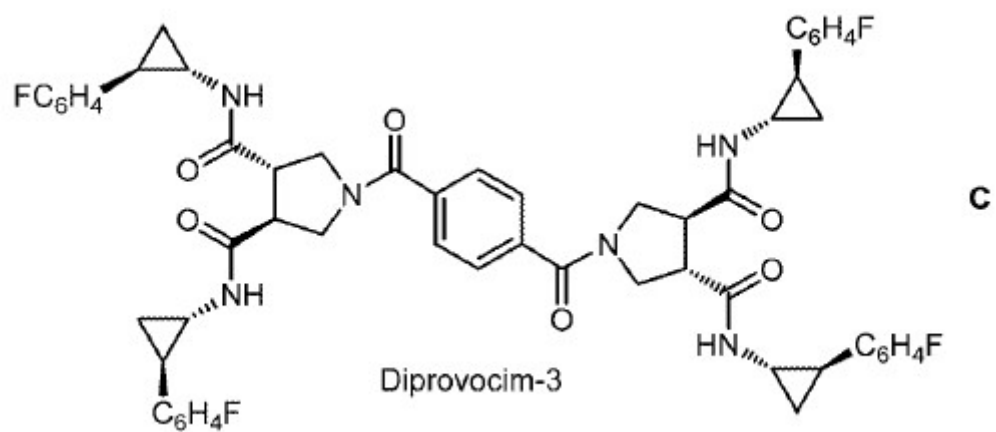
[0069] Em um composto de Fórmula Va, o número de átomos de carbono de um grupo R³ aqui é preferencialmente 2 a 18 e, mais preferencialmente, 10 a 16 átomos de carbono. Esse grupo hidrocarbila é também mais preferencialmente um grupo alquila que é um substituinte de cadeia linear embora ramificações de metila e etila possam ser tolerados conforme podem ligações duplas e/ou triplas na cadeia. Compostos de substituinte de hidrocarbila cíclica e substituintes que contêm anel carbocíclico também podem ser utilizados.

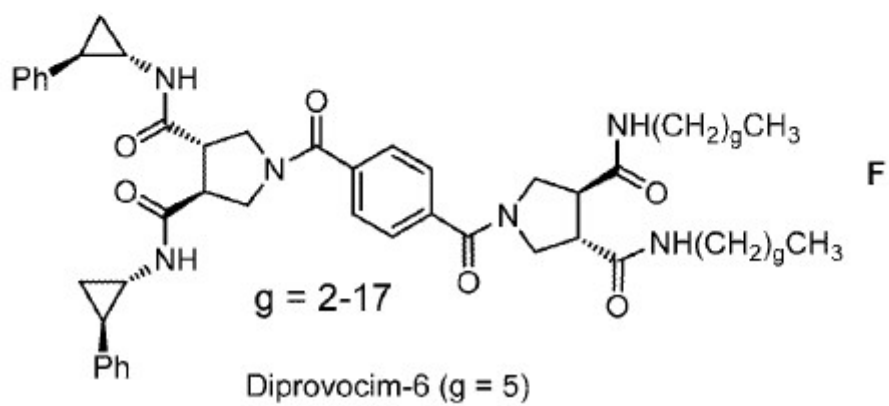
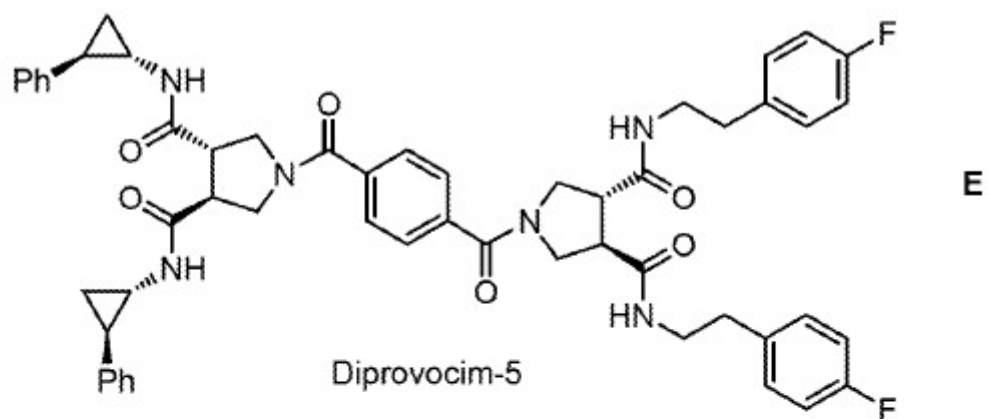
[0070] É também preferencial que W seja CH. A Fórmula estrutural Ia, mostradas abaixo, incorpora várias das preferências acima.

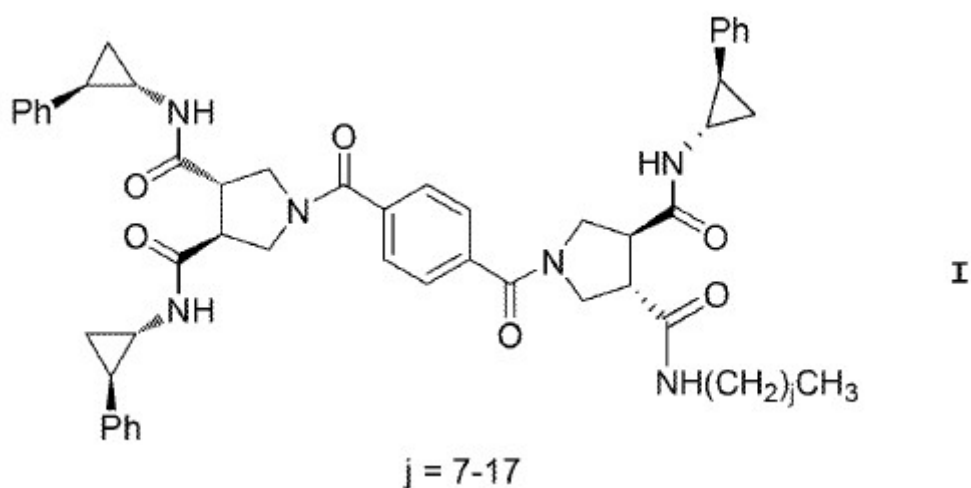
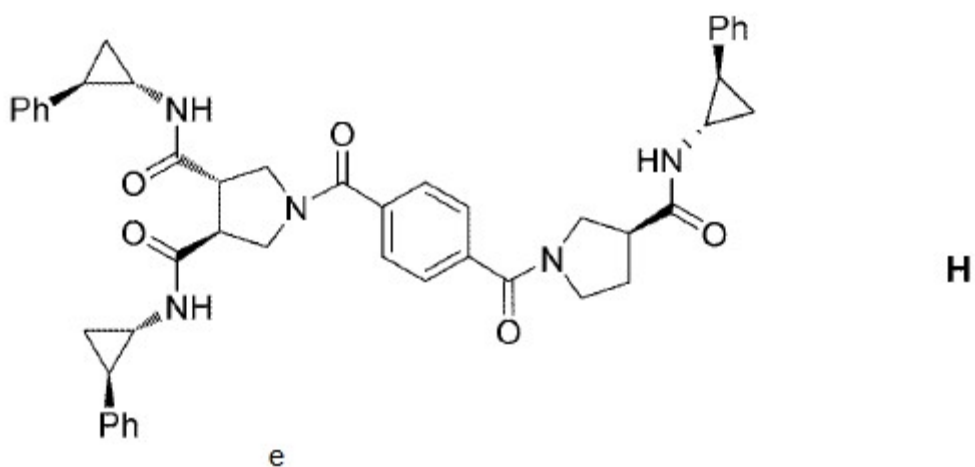
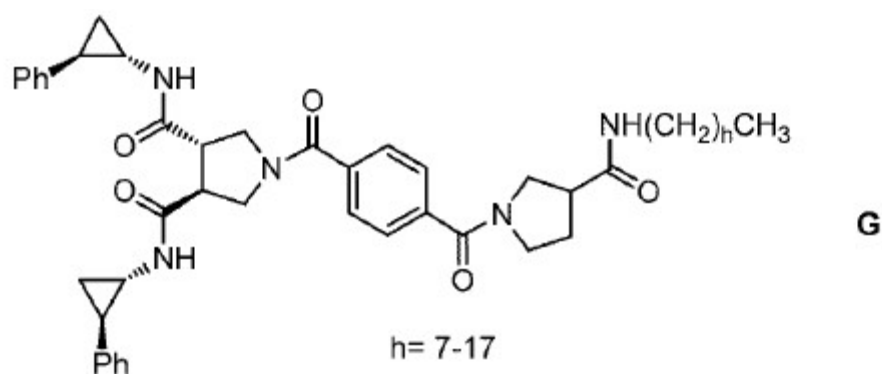


[0071] Fórmulas estruturais de compostos de Fórmula Ia atualmente mais preferidos nos quais -Z é hídrico (-H) são mostradas abaixo como compostos de Fórmulas A, B, C, D, E, F, G, H, e I. Números de Diprovocim do documento nº WO 2018005812 são incluídos para referência.









[0072] Para um Composto de Fórmula F, "g" em ambos os grupos amido retratados é preferencialmente o mesmo número (comprimento) de 5 a 9 grupos metileno para atividade máxima contra tanto células THP-1 humanas quanto macrófagos de camundongo, com g = 5 fornecendo o composto mais ativo para ambos os tipos de célula. Para um Composto de Fórmula G, "h" no grupo amido

retratado é 1 a 17, preferencialmente, 7 a 17 e, mais preferencialmente, 9 a 15. Para um Composto de Fórmula I, "j" no grupo amido retratado é 1 a 17, preferencialmente, 3 a 11, e mais preferencialmente, 5 a 9.

[0073] Um inibidor de ponto de controle imune contemplado é tipicamente um anticorpo intacto ou a porção contendo parátopo de um anticorpo. Tal anticorpo ou porção contendo parátopo de anticorpo contemplada é preferencialmente um anticorpo humanizado, quimérico ou humano monoclonal. Inibidores de ponto de controle aprovados por US FDA de ponto de controle ilustrativo incluem Keytruda® (antiPD-1), Yervoy® (antiCTLA-4), Tecentriq® (antiPD-L1), Cpdivo® (antiPD-1)], e Imfinzi® (antiPD-L1)]. CTLA-4 por si só se liga a proteínas B7-1 e B7-2 para inibir atividade de célula T. Moléculas que contém parátopo AntiB7-1 e antiB7-2 também podem ser usadas para bloquear a interação de CTLA-4/B7-1+B7-2, fornecendo assim atividade inibidora de ponto de controle tanto quanto os anticorpos para qualquer um do par de ligação PD-1 e PD-L1.

[0074] Moléculas marcadoras são discutidas em detalhes doravante. Esses materiais são tipicamente proteínicos e podem ser a proteína inteira ou uma porção imunogênica da proteína.

[0075] Quando usada em um método de inibir o crescimento de células doentes em um mamífero, uma quantidade suficiente de adjuvantes de um composto de Diprovocim, uma quantidade estimulante de célula T de um inibidor de ponto de controle imune, e uma quantidade imunizante de uma molécula marcadora relacionada a doença antigênica (imunogênica) são administradas para entrar em contato com células de mamífero hospedeiras. Aqueles três componentes podem ser administrados em conjunto, mas é preferencial que o inibidor de ponto de controle seja administrado separadamente do Diprovocim e o antígeno (imunógeno) que podem ser geralmente administrados em conjunto. Preferencialmente, o inibidor de ponto de controle é administrado de modo intravenoso (IV), enquanto o Diprovocim e antígeno são administrados em conjunto em uma composição farmacêutica imunizante de modo intramuscular (IM) ou subcutâneo (SC).

[0076] Aquelas administrações podem ser realizadas dentro do intervalo de um

alguns minutos, horas, duas ou semanas. Muitos inibidores de ponto de controle são anticorpos ou porções de anticorpo que contém parátopo que têm tipicamente uma meia-vida de termal in vivo na ordem de cerca de 2 a cerca de 4 semanas. [Consultar, rótulo de produto, Seção 12.3 por Keytruda® (antiPD-1), Yervoy® (antiCTLA-4), Tecentriq® (antiPD-L1), Opdivo® (antiPD-1)], e Imfinzi® (antiPD-L1)]. Desse modo, um inibidor de ponto de controle pode ser administrado antes, coincidentemente com ou alguns dias após a administração do Diprovocim e imunógeno.

[0077] Cada um dos componentes pode ser administrado uma pluralidade de vezes durante um curso de tratamento. O uso de múltiplas administrações é ilustrado no presente documento.

[0078] Um composto de Diprovocim é administrado em uma quantidade suficiente de adjuvante. Nos estudos ilustrados em outro ponto no presente documento, Diprovocim-1 (A) usado de modo ilustrativo no presente documento atuou como um adjuvante robusto in vivo ou agonista de TLR1/TLR2 que evocou uma atividade de adjuvante dependente de TLR2 potente in vivo em camundongos em cerca de 0,25 a cerca de 5 mg/kg (i.m.) quando coinjetado com um imunógeno em uma composição farmacêutica imunizante por uma rota intramuscular. Uma quantidade suficiente de adjuvantes pode ser prontamente determinada para mamíferos de peso maior por técnicas conhecidas na técnica. Adicionalmente, Diprovocim-1 não exibiu a toxicidade óbvia que é característica de administração de LPS quando usada como um adjuvante.

[0079] Um inibidor de ponto de controle é tipicamente utilizado em uma quantidade discutida no rótulo de produto. A dosagem e administrações ilustrativas incluem a seguinte com uso de melanoma como célula doente exemplificadora para uso nas quantidades citadas: Keytruda®-- melanoma: 2 mg/kg a cada 3 semanas; Yervoy®— adjuvante de melanoma: 10 mg/kg administrado de modo intravenoso por 90 minutos a cada 3 semanas por 4 doses, seguido por 10 mg/kg a cada 12 semanas por até 3 anos ou até que a recorrência de doença documentada ou toxicidade inaceitável; Tecentriq®--administrar 1.200 mg como uma infusão intravenosa por 60 minutos a cada 3 semanas; e melanoma irressecável com Opdivo® ou metastático 240 mg a

cada 2 semanas.

[0080] Uma quantidade imunizante de um molécula marcadora relacionada a doença antigênica (imunogênica) depende da imunogenicidade do marcador usado. A seleção de peptídeos imunogênicos para células B e células T é conhecida na técnica e não será passada aqui. Muitos tais peptídeos úteis foram relatados na técnica, mas não foram formuladas com tanto sucesso como vacinas conforme desejado, presumivelmente devido a uma falta de ajuda de célula T. Acredita-se que a composição farmacêutica imunizante de três partes supera essa deficiência.

[0081] Muitas moléculas marcadoras relacionadas a doença pequenas tais como peptídeos que têm um comprimento de cerca de 5 a cerca de 20 resíduos são por si só fracamente imunogênicos, e são frequentemente mais bem utilizados como haptenos quimicamente ligados a uma molécula carreadora. Moléculas carreadoras proteínáceas ilustrativas incluem hemocianina de lapa de buraco de fechadura (KLH), molécula de superfície de hepatite B (HBsAg), o núcleo de hepatite B (cápside; HBcAg), ovalbumina, albumina de soro bovino, gamaglobulina bovina e gamaglobulina humana foram usadas como um carreador de hapteno, como têm muitas outras moléculas foram usadas na literatura.

[0082] Um molécula marcadora relacionada a doença contemplada está presente em e/ou sobre células doentes. Células doentes são tipicamente cancerosas ou infectadas por patógeno .

[0083] Moléculas marcadoras relacionadas a doença ou porções úteis como imunógenos presentes em e/ou sobre células tumorais sólidas, incluem marcadores de célula tronco de câncer (CSC) que são raramente expressos em células de tecido normais são listadas abaixo. [Kim et al., BMB Rep 50 (6):285 a 298 (2017)]. Marcadores de CSC exemplificadores que são amplamente ausentes em células normais (livres de doenças) e presentes em células doentes incluem CD96, CD20, DLL4, CD55, TIM-3, CXCR1, CD54, CD114, LGR5, CD105, CD56, CD13, CD271, CD34, CXCR4, CD26, CD117, CD10, CD146, Notch2, CD49f, CD24, ABCG2, PODXL-2, Cripto-1, CD326, CD90, CD133, SSEA1, TRA-1-81, TRA-1-60, SSEA4, SSEA3, CD151, CD340 e CD44.

[0084] Moléculas marcadoras relacionadas a doença exemplificadoras são tipicamente presentes em e/ou sobre células tumorais sólidas. Tumores sólidos ilustrativos incluem células de osteosarcoma, células de sarcoma de Kaposi, células de melanoma, células de câncer de próstata, células de glioblastoma, células de carcinoma pulmonar de célula pequena, células de câncer de mama, células de câncer de fígado, células de câncer de cólon, células de câncer ovariano, células de câncer renal, células de câncer gástrico, células de neuroblastoma, células de câncer pancreático e células de linfoma de Hodgkin.

[0085] Uma molécula marcadora relacionada a doença contemplada ou porção da mesma também pode estar presente em e/ou sobre células infectadas com patógeno. Patógenos de infecção ilustrativos incluem um ou mais dentre um vírus, bactéria, fungo e parasita unicelular.

[0086] Vírus ilustrativos incluem influenza, vírus de hepatite A, B, C e D, vírus de herpes tais como Varicela-zóster (catapora), Herpes simplex 1 e 2 (HSV1 e HSV2), vírus de papiloma humano (HPV), e similares. Patógenos bacterianos ilustrativos incluem *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, e similares. Um parasita unicelular ilustrativo é o esporozóito de malária de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. bergerii* ou *P. yoelli*.

[0087] Imunógenos proteináceos ilustrativos incluem os seguintes peptídeos de molécula marcadora relacionada a doença que são listados abaixo com uma citação a sua fonte de publicação.

Patente nº U.S. 6.942.866

EPÍTOPOS DE CÉLULA B MALARIAL

P. falciparum

(NANP)₄

SEQ ID NO:

NANPNVDP(NANP)₃NVDP

SEQ ID NO:

NANPNVDP(NANP)₃

SEQ ID NO:

(NANP)₃NVDPNANP

SEQ ID NO:

NANPNVDP(NANP)₃NVDPNANP

SEQ ID NO:

NPNVDP(NANP)₃NV

SEQ ID NO:

NPNVDP(NANP)₃NVDP

SEQ ID NO:

P. falciparum	
NPNVDP(NANP) ₃ NVDPNA	SEQ ID NO:
NVDP(NANP) ₃ NV	SEQ ID NO:
NVDP(NANP) ₃ NVDP	SEQ ID NO:
NVDP(NANP) ₃ NVDPNA	SEQ ID NO:
DP(NANP) ₃ NV	SEQ ID NO:
DP(NANP) ₃ NVDP	SEQ ID NO:
DP(NANP) ₃ NVDPNA	SEQ ID NO:

P. Vivax	
(NANP) ₄	SEQ ID NO:
NANPNVDP(NANP) ₃ NVDP	SEQ ID NO:
DRAAGQPAGDRADGGQPAG	SEQ ID NO:
ANGAGNQPGANGAGDQPGA-	SEQ ID NO:
NGADNQPGANGADDQPG	SEQ ID NO:
ANGAGNQPGANGAGDQPG	SEQ ID NO:
ANGADNQPGANGADDQ PG	SEQ ID NO:
ANGAGNQPGANGADNQPG	SEQ ID NO:
ANGADNQPGANGADDQ PG	SEQ ID NO:
APGANQEGGAAAPGANQEGGAA	SEQ ID NO:

P. Bergeii	
(DP ₄ NANP) ₂	SEQ ID NO:

P. Yoelli	
(QGPGAP) ₄	SEQ ID NO:

EPÍTOPO DE CÉLULA T UNIVERSAL MALARIAL

P. Falciparum

GIEYLNKIQNSLSTEWSPCSVT

SEQ ID NO:

P. Vivax

YLDKVRATVGTEWTPCSVT

SEQ ID NO:

P. Yoelli

EFVKQISSQLTEEWSQCSVT

SEQ ID NO:

Patente nº U.S. 8.017.127

EPÍTOPOS DE CÉLULA B M2 DE INFLUENZA

[0088] Conforme é notado no documento de patente nº U.S. 8.017.127, a proteína M2 é expressa em células infectadas pelas cepas de influenza A. Os resíduos de terminal N 1-24 da proteína M2 se estende através da membrana da célula infectada. Essa porção extracelular da proteína é denominada como M2e. Como consequência, o uso da porção M2e extracelular de influenza A dessa proteína como o marcador imunológico pode fornecer proteção de todas as cepas de influenza. Desse modo, as mudanças anuais em seleção de vacina de influenza podem ser evitadas.

Sequência

SEQ ID NO:

SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD
 SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
 SLLTEVETPIRNEWGARANDSSD
 SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD
 SLLTEVETPIRNEWGSRCDSSD
 SLLTEVETPIRNEWGCRSDSSD
 SLLTEVETPIRNEWGCRANDSSD
 SLLTEVETPIRNEWGARCNDSSD
 MLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
 MLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD
 MGISLLTEVETPIRNSWGCRCD-
 SSDELLGWLWGI

Sequência	SEQ ID NO:
LLTEVETPTRNGWGCRCDSSD	
LLTEVETPIRNEWECRCNGSSD	
LLTEVETPTKNEWECRCNDSSD	
LLTEVETPTRNGWECKCSDSSD	
LLTEVDLTRNGWGCRCDSSD	
LLTEVETLTRNGWECKCRDSSD	

Proteína B de Influenza

NNATFNVTNVNPISHIR

Patente nº U.S. 4.599.231

ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE DE VÍRUS DE HEPATITE B

[0089] O antígeno de superfície de vírus de hepatite B (HBsAg) fornece ambos epítomos de polipeptídeo de célula B e célula T. Um número de cada tipo de epítomo conforme revelado no documento de patente nº U.S. 4.599.231 é definido abaixo na tabela junto com suas denominações de peptídeo, e posição de sequência parenterizada da terminação N, conforme citado nessa patente com base em DNA de um doador de ayw (P49) e um doador de adw (P72 e P73).

Sequência	SEQ ID NO
-----------	-----------

Epítomo de Célula B

P49 (110-137)
FPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTS MYPS

P49 (110-137)
FPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTS MYPS
C

P49a (125-137)
MTTAQGTS MYPS C

P72 (125-137)
IPGSTTTSTGPCKTCTTPAQGNS MFPS
C

P72a (125-137)

Sequência	SEQ ID NO
Epítopo de Célula B	
TTPAQGNSMFPSC	
P73 (107-137)	
CPLIPGSTTTSTGPCKTCTTPAQGNSM	
FPSC	

Epítopo de Célula T

PI (48-81)
CLGQNSQSPTSNSHSPTSCPPTCPGYR
WMCLRRF I
P5 (38-52)
SLNFLGGTTVCLGQN
P5a (74-52)
VCLGQN
P6 (95-109)
LIFALVLLDYQGMLPVCPL

Patente nº U.S. 5.180.806

PEPTÍDEOS MARCADORES DE VÍRUS DE PAPILOMA HUMANO (HPV)

[0090] Vírus de papiloma induzem hiperproliferações benignas, displásticas e malignas de pele ou epitélio mucosal. Mais do que 50 tipos (cepas) de vírus de papiloma humano (HPV) foram identificados. Em humanos, diferentes tipos de vírus de papiloma são conhecidos por causar doenças distintas. Por exemplo, HPV tipos 1 e 2 causam verrugas comuns, e tipos 6 e 11 causam condilomas e verrugas planas genitais. Em contraste, HPV tipos 16, 18 e 33 são transportados em uma maioria de cânceres cervicais e não causam o condiloma usual, mas, em vez disso, persistem de forma difusa no endotélio cervical que exhibe somente mudanças patológicas mínimas. Pensa-se que os tipos de HPV associados a câncer cervical são mantidas em um estado latente em tecidos cervicais de endotélio por anos após a infecção inicial e então progridem em alguns casos para causar câncer cervical.

[0091] Patente nº U.S. No. 5.180.806 revela várias sequências de peptídeo que

induzem a produção de anticorpos. Marcadores de peptídeo ilustrativos de sequências de HPV relacionadas tipo 16 revelados no documento de patente nº U.S. 5.180.806 são definidos abaixo como ilustrativos. Essa patente também revela sequências de peptídeo do tipo 18 e tipo 33, assim como sequências codificadas pelo E2 ORF de HPV tipos 6, 11, 18 e 33.

POLYPEPTÍDEOS RELACIONADOS A HPV TIPO 16

Sequência	SEQ ID NO
Epítipo de Célula B	

MADPAGTNGEEGTGC
 HEDEDKENDGDSLPTC
 RPFKSNKSTCC
 CCDWCIAAFGLTPSI
 TYDSEWQRDQFLSQQVKIPC
 HKSAIVTLTYDSEWQRDQC
 CINCQKPLCPEEKQRH

[0092] Uma composição imunizante contemplada também tipicamente contém sais farmacologicamente aceitáveis, tampões e excipientes similares que são coletivamente denominados como diluentes farmacologicamente (ou fisiologicamente) aceitáveis ou carreadores conforme comparado aos que podem estar presentes em uma composição que não é destinada para uso farmacêutico, como em um ensaio *in vitro*. Essas composições são discutidas em mais detalhes doravante.

[0093] Um composto de Diprovocim útil no presente documento pode ser fornecido para uso por si só, ou como um sal farmacologicamente aceitável. Sais úteis exemplificadores para um composto contemplado incluem, porém, sem limitação, o seguinte: sulfato, cloridrato, hidrobrometo, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, benzenosulfonato, bissulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, ciclopentanepropionato, dodecilsulfato, etanossulfonato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, cloridrato, hidrobrometo, hidriodeto, 2-hidroxi-etanossulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenossulfonato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenil-propionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato,

tiocianato, tosilato, mesilato e undecanoato.

[0094] Sais do grupo carboxilato incluem sódio, potássio, magnésio, cálcio, alumínio, amônio, e os muitos sais de amônio substituídos.

[0095] O leitor é direcionado a Berge, J. Pharm. Sci. 1977 68(1):1-19 para listas de ácidos farmaceuticamente aceitáveis comumente usados e bases que formam sais farmaceuticamente aceitáveis com compostos farmacêuticos.

[0096] Em alguns casos, os sais também podem ser usados como um auxiliar no isolamento, purificação ou resolução dos compostos da invenção. Em tais casos, o ácido ou base usados e o sal preparado não precisam ser farmaceuticamente aceitáveis.

[0097] Uma composição farmacêutica imunizante contemplada contém uma quantidade eficaz de adjuvante de um Composto de Fórmula V ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos dissolvidos ou dispersos em um carreador fisiologicamente (farmaceuticamente) aceitável junto com o marcador imunológico. Tal composição pode ser administrada a células de mamíferos em vitro como em uma cultura celular para entrar em contato com aquelas células, ou as células podem ser contatadas em vivo como em um mamífero hospedeiro vivo em necessidade. Conforme apresentado a partir dos dados no presente documento, um composto contemplado de Diprovocim presente em quantidades femtomolares a nanomolares fornece um efeito adjuvante em estudos de ensaio in vivo e in vitro.

[0098] Quando usados como uma adjuvante de vacina, um Composto de Fórmula V é preferencialmente administrado em conjunto com o imunógeno marcador selecionado. Ambos os componentes são preferencialmente presentes em conjunto em uma composição farmacêutica imunizante única conforme notado acima. No entanto, os dois ingredientes podem estar presentes em composições farmacêuticas imunizantes separadamente administradas, e aquelas composições separadas podem ser administradas até cerca de um a cerca de duas horas de diferença. Isso é preferencial, quando duas composições separadas são administradas, que as mesmas sejam administradas com maior proximidade de tempo possível uma da outra.

[0099] Em outra modalidade, uma parte ou todo o composto de Diprovocim utilizado pode ser quimicamente ligado ao composto de marcador imunizante. Essa ligação química pode ser formada com uso do substituinte Z mostrado in Formula V como em que um substituinte Z que inclui um grupo carboxila pode ser ligado a um grupo amino de um composto de marcador de peptídeo imunogênico. Alternativamente, em que um marcador imunológico composto é utilizado como um hapteno ligado a uma molécula carreadora, o composto de Diprovocim também pode ser quimicamente ligado à mesma molécula carreadora.

[00100] Uma composição farmacêutica imunizante contemplada é tipicamente administrada in vivo a um indivíduo em necessidade do mesmo uma pluralidade de vezes dentro de um mês, tal como diariamente ou semanalmente, e pode ser administrado por um período de vários meses a vários anos. De modo mais comum, uma composição contemplada é administrada uma pluralidade de vezes por um curso de tratamento.

[00101] Uma composição farmacêutica imunizante contemplada é preferencialmente adaptada para administração parenteral. Desse modo, uma composição farmacêutica imunizante está preferencialmente em forma líquida quando administrada, e com máxima preferência, o líquido é um líquido aquoso, embora outros líquidos sejam contemplados conforme discutido abaixo, e uma composição presentemente de máxima preferência é uma preparação injetável.

[00102] Desse modo, preparações injetáveis, por exemplo, soluções ou suspensões aquosas ou oleaginosas injetáveis estéreis podem ser formuladas de acordo com a técnica conhecida com uso de agentes de dispersão ou umidificação e agentes de suspensão adequados. A preparação injetável estéril também podem ser uma solução ou suspensão injetável estéril em um diluente ou solvente parenteralmente não tóxico, por exemplo, como uma solução em 1,3-butanediol. Entre os veículos e solventes aceitáveis que podem ser empegados são água, solução de Ringer, e solução de cloreto de sódio isotônica, salino tamponado com fosfato.

[00103] Outras composições farmacêuticas líquidas incluem, por exemplo, soluções adequadas para administração parenteral. Soluções d' água estéreis de um

Composto de Fórmula V ou solução estéril de um Composto de Fórmula V em solventes que compreendem água, etanol, ou propileno glicol são exemplos de composições líquidas adequadas para administração parenteral. Em alguns aspectos, um Composto contemplado de Fórmula V é fornecido como um pó seco que deve ser dissolvido em um meio líquido apropriado tal como cloreto de sódio para injeção antes do uso.

[00104] Adicionalmente, óleos fixos estéreis são convenientemente empregados como um solvente ou meio de suspensão. Para esse propósito, qualquer óleo fixo brando pode ser empregado incluindo mono, ou diglicerídeos sintéticos. Adicionalmente, ácidos graxos tais como ácido oleico encontram uso na preparação de uma composição injetável. Acetamida de dimetila, tensoativos que incluem detergentes iônicos e não iônicos, glicóis de polietileno podem ser usados. Misturas de solventes e agentes umidificantes tais como aqueles discutidos acima também são úteis. Soluções estéreis podem ser preparadas dissolvendo-se o componente ativo no sistema de solvente desejado, e então passando-se a solução resultante através de um filtro de membrana para esteriliza-la ou, alternativamente, dissolvendo-se o composto estéril em um solvente anteriormente esterilizado sob condições estéreis.

[00105] Um mamífero que tem células doentes em necessidade de tratamento (um indivíduo) e ao qual uma composição farmacêutica que contém pelo menos um Composto de Fórmula V e um marcador imunológico composto é administrada pode ser um primata, tal como um humano, um símio, tal como um chimpanzé ou gorila, um macaco tal como um macaco cinomolgo ou um macaco de gênero macaca, um animal de laboratório tal como um rato, camundongo ou coelho, um animal de estimação, tal como um cão, gato, cavalo, ou um animal de alimentação, tal como um vaca ou boi, ovelha, cordeiro, porco, cabra, lhama ou similares.

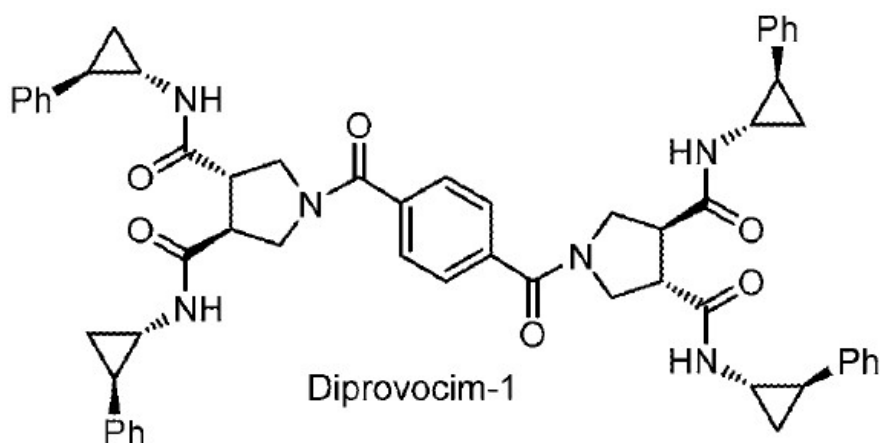
[00106] Preferencialmente, a composição farmacêutica está em forma de dosagem unitária. Em tal forma, a composição é dividida em doses de unidade que contém quantidades apropriadas do Diprovocim e imunógeno. A forma de dosagem unitária pode ser uma preparação embalada, sendo que a embalagem contém quantidades distintas da preparação, por exemplo, em frascos ou ampolas.

RESULTADOS

DIPROVOCIM INDUZ PROTEÇÃO DE CITOCINA TANTO EM CÉLULAS HUMANAS QUANTO EM CÉLULAS DE CAMUNDONGO

[00107] A partir de uma biblioteca química que contém aproximadamente 100.000 membros, uma classe de compostos foi identificada com simetria bilateral com capacidade de ativar biossíntese de TNF em células mieloides de THP-1 humana diferenciada por PMA. Os membros iniciais da classe surgiram de uma sub-biblioteca de compostos não revelada projetada para promover dimerização de receptor de superfície celular (18).

[00108] Diprovocim-1, abaixo, foi desenvolvida a partir dessa classe após estudos de relação de atividade de estrutura (SAR) extensivos.



[00109] Sua produção de TNF dependente de dose induzida por células de THP-1 (EC_{50} 110 pM) e PBMC humana (EC_{50} 875 pM) (Figura 0A e Figura 1B), e por macrófagos peritoneais de camundongo (EC_{50} 1 a 3 nM) e células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC) (EC_{50} 6,7 nM) (Figura 0C e Figura 1D). Além do TNF, Diprovocim-1 induziu a produção de IL-6 por BMDC de camundongo (Figura 0E). No entanto, Diprovocim-1 falhou em estimular produção de FN tipo 1 por macrófagos peritoneais de camundongo (Figura 7). Os outros Diprovocims numerados estudados e aqueles definidos pela Fórmula estrutural I também compartilham essas atividades. DIPROVOCIM ALVEJA TLR1/TLR2 E ATIVA MARCA A JUSANTE E VIA DE SINALIZAÇÃO DE NF-KB

[00110] Para determinar o alvo molecular dos Diprovocims, efeitos foram

analisados em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6J de tipo selvagem e camundongos C57BL/6J deficientes de vários componentes de sinalização de TLR. A indução de TNF por Diprovocim foi completamente ausente em macrófagos deficientes de TLR1- ou TLR2, mas não em macrófagos deficientes de TLR-6 (Figura 1A). A atividade de Diprovocim foi também drasticamente reduzida em macrófagos de células deficientes de MyD88, TIRAP, e IRAK4 (Figura 1A). Esses dados sugeriram que Diprovocim alveja o heterodímero de TLR1/TLR2 de camundongo.

[00111] O anticorpo TLR1 ou TLR2 reduziu significativamente o efeito de Diprovocim em células de THP-1, indicando que TLR1/TLR2 humano é também um alvo de moléculas de Diprovocim (Figura 1B). Diprovocim induziu fosforilação de IKK α , IKK β , p38, JNK e ERK, assim como degradação de I κ B α em células de THP-1 e macrófagos peritoneais de camundongo, indicando que Diprovocims ativam sinalização de TLR1/TLR2 convencional, incluindo MAPK e sinalização de NF- κ B canônica (Figura 1C e Figura 2D) .

DIPROVOCIM EXIBE ATIVIDADE DE ADJUVANTE IN VIVO

[00112] A imunização intramuscular de camundongos de tipo selvagem com ovalbumina (OVA) mais tanto alume como Diprovocim induziu níveis similares de IgG específicos de OVA de soro, que foram altamente elevados em comparação a níveis induzidos por imunização com OVA mais Veículo (Figura 2A à Figura 3C). Embora a imunização com OVA+alume tenha induzido primeiramente o IgG1 de subclasse de Ig relacionada a Th2 de subclasse de Ig relacionada a Th2, OVA-i-Diprovocim induziu IgG2b relacionada tanto a IgG1 quanto a Th1 (Figura 2B e Figura 3C).

[00113] Células dendríticas (DCs) purificadas a partir da drenagem de gânglios linfáticos e baços 24 horas após imunização de camundongos com OVA+Diprovocim ativou células T CD8 de OT-I cocultivadas com as mesmas, conforme evidenciado com a regulação ascendente de CD69 nas células de OT-I (Figura 2D). Em contraste, DCs de camundongos imunizados com OVA+Veículo falhou em induzir expressão de CD69 em células T CD8 de OT-I (Figura 2D). Essa constatação sugere que Diprovocims ativam a apresentação cruzada de antígeno por DCs e iniciação cruzada de células T CD8 in vivo.

[00114] Para investigar mais a possibilidade de iniciação cruzada estimulada por um Diprovocim resultar no desenvolvimento de capacidade de eliminação por células CD8+T in vivo, um ensaio de eliminação de CTL foi realizado. Células alvo pulsadas por peptídeo rotulado com marcador fluorescente e de OVA (resíduos, 257-263) foram injetadas i.v. em camundongos imunizados com OVAH-Diprovocim e o número de células alvo vivas foram medidas por citometria de fluxo dois dias depois. Cerca de 70% das células alvo foram eliminadas em camundongos imunizados com OVA+Diprovocim, em comparação a cerca de 10% em camundongos imunizados com OVA+Veículo (Figura 2E). Esses dados demonstram que Diprovocim exibe atividade de adjuvante em produção de anticorpo específica de antígeno e eliminação de CTL, que foi anulada em camundongos deficientes de TLR1- e/ou TLR2 (Figura 2 A a C, F e G) .

INIBIÇÃO COMPLETA DE CRESCIMENTO DE TUMOR BL6 POR BLOQUEIO DE PONTO DE CONTROLE E VACINA ANTICÂNCER COM ADJUVANTE COM DIPROVOCIM COMBINADOS

[00115] A atividade de adjuvante de Diprovocim foi examinada em imunização preventiva de camundongos de tipo selvagem contra B16 melanoma que expressa OVA (B16-OVA) (Figura 3A). Camundongos foram injetados i.m. distal à sítio de injeção de célula tumoral com OVA com ou sem Diprovocim no mesmo dia, mas antes da inoculação com células de B16-OVA. Taxas de crescimento de tumor e vezes de sobrevivência foram similares para camundongos imunizados com Veículo por si só, Diprovocim por si só, ou OVA por si só (Figura 3B e Figura 4C). Em relação a OVA por si só, a imunização com Diprovocim+OVA modestamente, mas taxa de crescimento de tumor significativamente reduzida, mas falhou em prolongar a sobrevivência; um efeito similar foi observado com imunização de OVA combinada com tratamento antiPD-L1 (Figura 3B e Figura 4C) .

[00116] De modo marcante, embora sem efeito por si só (Figura 8A e Figura 8B) quando tratamento antiPD-L1 foi adicionado à imunização de Diprovocim+OVA, houve inibição completa de crescimento de tumor e 100% de sobrevivência por oito semanas de observação (Figura 3B e Figura 4C). Esse efeito antitumor drástico foi dependente

da imunização de OVA visto que Diprovocim por si só combinada com tratamento antiPD-L1 não teve efeito no crescimento de tumor ou sobrevivência de camundongo (Figura 3D e Figura 4E); essa constatação é coerente com a fraca imunogenicidade de melanoma B16 (19-21) .

[00117] Para determinar a possibilidade de camundongos sobreviventes terem sido providos com memória específica e a longo prazo direcionada contra o antígeno de câncer, os sobreviventes de cinco semanas de Figura 30 foram novamente desafiados com células de B16-OVA e B16 células que carecem de OVA (B16). Na ausência de qualquer terapia adicional, falha completa de crescimento de tumor B16-OVA foi observada, enquanto tumores tipo B16 cresceram rapidamente (Figura 3F). Ambas as células tumorais tipo B16 e B16-OVA cresceram em taxas similares em camundongos C57BL/6J naive (Figura 3F) .

[00118] Tomados em conjunto, esses dados indicam que, quando usados como um adjuvante em uma vacina de câncer, um Diprovocim promove imunidade antitumor específica de antígeno, que é amplamente intensificada quando combinada com bloqueio de ponto de controle de célula T em camundongo. A imunização com um Diprovocim como um adjuvante produz respostas de memória específicas de antígeno que protege o hospedeiro de reincidência de crescimento de tumor.

[00119] O efeito antitumor de um Diprovocim foi examinado em imunização terapêutica de camundongos com tumores tipo B16-OVA já estabelecidos. Camundongos C57BL/6J foram imunizados com OVA com ou sem um Diprovocim no dia de inoculação de tumor ou três dias depois disso e receberam uma intensificador de imunização sete dias depois (Figura 3A). Em alguns camundongos, alume foi substituído por Diprovocim para permitir comparação direta entre esses dois adjuvantes. Para todas as condições, o tratamento antiPD-L1 foi iniciado no dia 3 após a inoculação de tumor e repetido a cada três dias depois disso por 12 dias.

[00120] Camundongos imunizados com OVA por si só no dia de inoculação de tumor sobreviveu uma média de 24 dias, e 100% dos camundongos (8/8) morreram 38 dias após a inoculação de tumor. Conforme esperado, Diprovocim+OVA administrado no dia de inoculação de tumor inibiu completamente o crescimento de

tumor, permitindo que 100% dos camundongos (8/8) sobrevivessem por 54 dias de observação (Figura 3G e Figura 4H). Quando alume foi usado em vez de um Diprovocim no mesmo estudo, crescimento de tumor foi parcialmente inibido, e o tempo de sobrevivência médio foi 37 dias, com sobrevivência de 25% dos camundongos (2/8) após 54 dias (Figura 3G e Figura 4H).

[00121] Quando a imunização foi atrasada até três dias após a inoculação de tumor, Diprovocim+OVA ainda inibiu significativamente o crescimento de tumor e prolongou a sobrevivência média em comparação a OVA por si só (41 dias vs. 22 dias) (Figura 31 e Figura 4J). Em contraste, alume+OVA inibiu o crescimento de tumor, mas aumentou somente ligeiramente o tempo de sobrevivência médio (30 após); a sobrevivência curve para alume+OVA não foi significativamente diferente da curva para OVA por si só ($P = 0,082$) (Figura 31 e Figura 4J). Em tratamento pré- e pós-tumor, o efeito de Diprovocim no crescimento de tumor, taxa de sobrevivência e tempo de sobrevivência foi superior ao do alume.

DIPROVOCIM INTENSIFICA AS RESPOSTAS DE CTL ANTITUMOR

[00122] O mecanismo celular pelo qual a imunização desejada por tratamento antiPD-L1 e Diprovocim-adj combinados elimina tumores foi examinada. Leucócitos de filtração de tumor (TILs) de camundongos imunizados com Diprovocim+OVA ou alume+OVA foram analisados três dias após a inoculação de tumor (Figura 4A). Tumores foram coletados 14 dias após a inoculação, e suspensões de célula única foram manchadas por anticorpo e analisadas por citometria de fluxo para detectar leucócitos totais, células T CD4 e CD8, células NK, DCs, e macrófagos. Os leucócitos foram também manchados com anticorpo ao tetrâmero MHC classe I H-2K^b ligado ao peptídeo OVA (resíduos 257-264), assim como anticorpo contra CDS para identificar células T CD8 específicas de tumor.

[00123] Imunizações de OVA que contêm um Diprovocim aumentaram significativamente a frequência de leucócitos em tumores em comparação a Veículo+OVA (Figura 4B). Análises adicionais desses TILs revelaram que um Diprovocim aumentou as frequências de células T CD4 e CD8 incluindo células T CD4 e CD8 ativadas (CD44^{alta}) e células T CD8 específicas de OVA, assim como a

frequência de células NK (Figura 4C à Figura 5H).

[00124] Imunização de Alume+OVA mostrou uma tendência a aumentar TILs (Figura 4B), que aumentaram a significância estatística para total e células T CD8 CD44^{alta} (Figura 4E e Figura 5F). No entanto, a magnitude do aumento foi reduzida em comparação ao induzido por Diprovocim+OVA. As células T CD8 específicas de OVA não foram aumentadas por imunização de alume+OVA (Figura 4G) no dia 14 após a inoculação de tumor; nem as Células T de CD4 CD44^{ALTA} (Figura 4C e Figura 5D), nem as células NK em comparação a Veículo+OVA (Figura 4H).

[00125] As frequências de DCs intratumor e macrófagos foram similares para camundongos imunizados com Veículo+OVA, Diprovocim+OVA, e alume+OVA (Figura 4I e Figura 5J). De modo geral, esses dados indicam que as frequências intratumor de células T CD4 e CD8, células T CD4 e CD8 ativadas, células T CD8 específicas de OVA, e células NK, mas não DCs ou macrófagos, correlacionados com os efeitos antitumor de Diprovocim e alume em camundongos imunizados.

[00126] Para determinar a população (ou populações) de célula imune necessárias para o efeito antitumor de OVA mais antiPD-L1, camundongos foram esgotados de células T CD8, células T CD4, células NK, ou todas as três populações de célula com uso de anticorpos específicos do tipo celular. Os anticorpos de esgotamento foram administrados i.p. no dia de inoculação de tumor B16-OVA (dia 0) e a cada três dias depois disso por 15 dias (Figura 4K). O efeito de Diprovocim+OVA tanto no crescimento de tumor quanto na sobrevivência de camundongo foi anulado quando camundongos foram esgotados de células T CD8 ou todos os três tipos de célula em conjunto (CD4 T, CD8 T, células NK) (Figura 4L e Figura 5M). Em contraste, esgotamento de células T CD4 ou células NK teve pouco efeito na atividade antitumor de Diprovocim+OVA (Figura 4L e Figura 5M).

[00127] De modo interessante, uma ligeira diferença estatisticamente significativa entre os efeitos de esgotamento de célula T CD8 vs. Esgotamento de célula CD4+CD8+NK foi notado no crescimento de tumor em camundongo tratado com Diprovocim+OVA mais antiPD-L1, no qual o crescimento de tumor foi maior em camundongo esgotado de todos os três tipos de célula. No entanto, essa diferença

não se traduziu a uma diferença tanto na taxa de sobrevivência como em tempo. Essa constatação sugere uma função menor de qualquer das células T CD4, células NK, ou ambas, em mediar os efeitos antitumor de Diprovocim+OVA mais antiPD-L1. Esses dados demonstram que células T CD8 são necessários para erradicação de tumor por imunização terapêutica de Diprovocim+OVA e inibição de ponto de controle em camundongo.

DISCUSSÃO

[00128] Acredita-se que vacinas de câncer alvejadas para neoantígenos de tumor podem intensificar o sucesso de inibição de ponto de controle imune para tratamento de câncer aumentando-se o número e ativação de CTLs específicos de tumor com capacidade de responder a inibidores de ponto de controle. No entanto, o tipo e magnitude da resposta de célula T à imunização depende criticamente do adjuvante de vacina; atualmente somente alguns adjuvantes são aprovados para uso em humanos.

[00129] Aqui, as ações de um adjuvante inovador e potente, Diprovocim, que envolve e ativa heterodímeros de TLR1/TLR2 de humano e camundongo são descritas. Um Diprovocim não tem similaridade estrutural a outros ligantes químicos sintéticos relacionados, nem aos ligantes naturais que ativam TLR1/TLR2 (22-26). Um Diprovocim é mais potente e eficaz em ativar TLR1/TLR2 humano do que Pam₃CSK₄ (Figura 9A e Figura 9B) , um ligante conhecido.

[00130] Em camundongos, um Diprovocim induz respostas humorais e de CLT dependentes de TLR1 e TLR2 fortes a um antígeno coadministrado. Quando combinado com inibição de ponto de controle, uma imunização com adjuvante de Diprovocim causa erradicação específica de antígeno de um tumor rapidamente fatal, e induz respostas de memória com capacidade de prevenir novo crescimento de tumor. A cura do tumor é observada apesar do fato de que a inibição de ponto de controle por si só é insuficiente para prevenir um resultado fatal (Figura 8A e Figura 8B) , o que sustenta a premissa dessa imunoterapia de combinação.

[00131] Os dados sustentam os seguintes eventos mecanísticos chave que mediam o efeito antitumor de imunização com adjuvante de Diprovocim mais inibição de ponto

de controle (Figura 5). Diprovocim se liga a TLR1/TLR2 em APCs, ativando-os para produzir citocinas pró-inflamatórias e captam os antígenos específicos de tumor administrados para processamento e apresentação por meio de MHC I e MHC II. A apresentação de antígeno, expressão de molécula coestimulatória, e secreção de citocina por APCs induzem a proliferação e ativação de células T CD4 e células T CD8 específicas de antígeno, que desenvolvem atividade citolítica voltada para células tumorais. Células NK são também ativadas por citocinas pró-inflamatórias e infiltram o sítio do tumor. A adição de antiPD-L1 inibe o mecanismo imunossupressor principal ativo no microambiente do tumor, permitindo ativação de célula T não inibida e proliferação em resposta à ligação de TCR/CD28 (27-29), promovendo adicionalmente lise de célula tumoral mediada por células T CD8.

[00132] Inúmeros relatórios documentam tanto efeitos pró-tumorigênico quanto efeitos antitumorigênicos de sinalização de TLR2, que pode depender do tipo de célula ou tipo de câncer sob estudo. Por exemplo, a sinalização de TLR2 sustenta o crescimento de tumor através de indução de citocinas supressivas imunes, tais como IL-10, e ativação de células supressoras derivadas mieloides e macrófagos associados a tumor (30-32). Em contraste, a sinalização de TLR2 também promove a regressão de tumor estimulando-se a ativação e apresentação cruzada de DC (33), e realizando-se regulação descendente de função Treg (34-36).

[00133] Para uma Diprovocim, o resultado geral de ativação de TLR2 sistêmica, no contexto de imunização de OVA combinada com a inibição de ponto de controle imune, foi lise de célula tumoral e inibição de crescimento de tumor mediado por células T CD8 específicas de antígeno de infiltração de tumor.

[00134] O índice terapêutico de um adjuvante presumivelmente depende da eficiência de alvejamento conjunto de antígeno a um APC, e ativação desse APC. O modo de interação entre um Diprovocim e TLR2 foi estudado por cristalografia de raio X, e seus contatos com essa subunidade do receptor serão relatados em outro ponto. A estrutura de um complexo de Diprovocim-TLR1/2 aponta para oportunidades para uma modificação de Diprovocim para incorporar peptídeos imunogênicos, que podem permitir a otimização do índice terapêutico garantindo-se que todas as moléculas

ativas de Diprovocim são acompanhadas por antígeno. Diprovocim é fácil de sintetizar e pode ser rapidamente adaptado para incorporar antígenos e neoantígenos associados a tumor. Esses recursos o tornam um candidato atrativo para desenvolvimento clínico.

MATERIAIS E MÉTODOS

CAMUNDONGOS

[00135] Camundongos C57BL/6J, Tlr2^{-/-}, Myd88^{-/-} e OT-I foram adquiridos do Laboratório Jackson. Camundongos Ly96^{-/-} (MD-2^{-/-}) foram da RIKEN BRC. Camundongos Tlr4^{Lps3/Lps3}, Tlr6^{int/int}, Tlr7^{rsq1/rsq1}, Tirap^{tor/tor}, Ticam1^{Lps2/Lps2}, Ticam1^{Lps2/Lps2} Irak4^{otiose/otiose} foram gerados em uma base C57BL/6J pura por mutagênese de ENU e são descritas em <http://mutagenetix.utsouthwestern.edu>.

[00136] Camundongos Tlr1^{-/-} foram criados por alvejamento de gene CRISPR/Cas 9. Camundongos C57BL/6J fêmeas foram superovulados por injeção de gonadotropina de soro de égua grávida 6.5 U (PMSG; Millipore), seguida por injeção de gonadotropina coriônica humana 6.5 U (hCG; Sigma-Aldrich) 48 horas depois. Os camundongos superovulados foram subsequentemente cruzados de um dia para o outro com camundongos C57BL/6J machos. No dia seguinte, ovos fertilizados foram coletados de ovidutos e mRNA Cas9 transcrito in vitro (50 ng/μl) e RNA de guia de pareamento de base pequena Tlr1 (50 ng/μl; 5'-CAAACCGATCGTAGTGCTGA-3'; SEQ ID NO: XX) foram injetados no citoplasma ou prónucleo dos embriões. Os embriões injetados foram cultivados em meio M16 (Sigma-Aldrich) a 37 °C em CO₂ a 5%. Para a produção de camundongos mutantes, embriões de estágio de duas células foram transferidos para a ampola do oviduto (10 a 20 embriões por oviduto) de camundongos fêmeas Hsd:ICR (CD-1) pseudo-grávidos (Harlan Laboratories).

[00137] Todos os procedimentos experimentais com uso de camundongos foram aprovados pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais Institucionais (IACUC) do Centro Médico do Sudoeste da Universidade Texas, e foram conduzidos de acordo com protocolos aprovados institucionalmente e diretrizes para cuidado e uso de animais. Todos os camundongos foram mantidos no Centro Médico do Sudoeste da Universidade Texas de acordo com protocolos aprovados institucionalmente.

ISOLAMENTO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS, BMDC, PBMC HUMANO E CULTURA CELULAR

[00138] Macrófagos elucidados por Tioglicolato foram recuperados 4 dias após injeção i.p. de 2 ml BBL meio de tioglicolato, reprodutor modificado (4% p/vol; BD Biosciences) por lavagem peritoneal com 5 ml de salino tamponado por fosfato (PBS). Os macrófagos peritoneais foram cultivados em meio de cultura celular de DMEM [sendo que DMEM contém 10% vol/vol FBS (Gemini Bio Products), 1% vol/vol de penicilina e estreptomicina (Life Technologies)] a 37 °C e ar a 95%/CO₂ a 5%.

[00139] Para BMDCs de murina, células de medula óssea foram cultivadas em pratos Petri em 10 ml de meio de cultura celular de DMEM contendo 10 ng/ml de GM-CSF de murina (R&D Systems). No dia 3 de cultura, o mesmo foi substituído por meio GM-CSF fresco. Células livremente aderentes foram transferidas para um prato Petri fresco e cultivadas por mais 4 d. PBMC humanas foram adquiridas junto à Stemcell Technologies. Células THP-1 (ATCC) foram diferenciados por tratamento com 100 nM PMA (Sigma) em meio celular de cultura RPMI [sendo que RPMI contém 10% vol/vol FBS (Gemini Bio Products), penicilina a 1% e estreptomicina (Life Technologies)] por 24 horas. Depois disso, células foram lavadas com PBS e cultivadas em meio celular de cultura RPMI fresco por 24 horas antes do uso em estudos.

MEDIÇÃO DE PRODUÇÃO DE CITOCINA

[00140] Células foram semeadas em placas de 96 poços em 100.000 células per poço e estimulados com um Diprovocim (dissolvido em DMSO e concentrações de DMSO final (<2%) foram mantidas constantes em todos os experimentos) por 4 h. TNF de camundongo, IL-6, ou IFN- γ , ou TNF humano nos sobrenadantes foram medidos por ELISA kits de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience e PEL Assay Science). O pré-tratamento com 20 μ g/ml de antiTLR1, antiTLR2 ou anticorpo de controle de isotipo (eBioscience) se deu por 1 hora. A menos que indicado de outro modo, células de camundongo foram de camundongos C57BL/6J de tipo selvagem.

WESTERN BLOTTING

[00141] Macrófagos peritoneais de camundongos ou células THP-1 humanas (1.000.000 por poço) foram estimulados em 12 placas por poço com um Diprovocim

em 500 nM para células de camundongo ou 5 nM para células humanas para os tempos indicados e lisados diretamente no tampão de amostra (Sigma). Lisatos de célula foram separados por SDS-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose. Membranas foram sondadas com os seguintes anticorpos: fosfo-IKK α (Ser176)/IKK β (Ser177), Ikb α , fosfo-p38 (Thr180/Tyr182), fosfo-JNK (Thr183/Tyr185), fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology) e β -Actina (Sigma).

IMUNIZAÇÃO E MEDIÇÃO DE RESPOSTA DE ANTICORPO

[00142] Ovalbumina EndoFit (OVA) com pureza mínima >98% (SDS-PAGE) e níveis de endotoxina <1 EU/mg foi adquirida da Invivogen. Camundongos (4 camundongos por grupo) foram imunizados i.m. com 100 μ g de OVA misturados com Veículo (DMSO:Tween 80:salino=1:1:8), com 10 mg/kg de Diprovocim, ou com 2 mg/kg de Alume (Adjuvante de Alidrogel 2%, Invivogen). Após 14 dias, titulações de soro de IgG, IgG1, ou IgG2b específicos de OVA (SouthernBiotech) foram medidos por ELISA.

ENSAIO DE ELIMINAÇÃO DE CTL IN VIVO

[00143] Camundongos C57BL/6J machos foram injetados i.m. com 100 μ g de OVA mais 10 mg/kg de Diprovocim (n=4 camundongos por grupo). Uma semana depois, camundongos C57BL/6J naive foram eliminados, e Esplenócitos foram coletados. Uma metade dos Esplenócitos foi deixada não pulsada, e metade foi pulsada com peptídeos OVA257-263 por 2 horas em meio completo [sendo que RPMI contém FBS a 10% vol/vol, penicilina 1% e estreptomicina] a 37 °C. As células não pulsadas e pulsadas por peptídeo foram rotuladas, respectivamente, com 0,5 μ M ("baixa") ou 5 μ M ("alta") CellTrace Violet (Invitrogen) em meio livre de soro por 20 minutos. Números iguais (2.000.000) de células CellTrace Violet^{alta} (pulsado por OVA) e CellTrace Violet^{baixa} (não pulsada) foram misturadas entre si e injetadas de modo intravenoso nos camundongos imunizados. Após 48 horas, o sangue de camundongos tratados foi coletado e submetido a análise de citometria de fluxo. O número de células vivas restantes de CellTrace Violet^{alta} e CellTrace Violet^{baixa} foi determinado e usados para calcular a porcentagem de células alvo pulsadas por peptídeo OVA eliminadas. Eliminação específica foi definida como a razão=células CellTrace Violet^{baixa}/ células

CellTrace Violet^{alta}.

[00144] A porcentagem de lise de célula alvo = $[1 - \text{razão não imunizada}/\text{razão imunizada}] \times 100$.

INOCULAÇÃO DE TUMOR, IMUNIZAÇÃO E MEDIÇÃO DE TUMOR

[00145] Células de B16-OVA (Células de melanoma B16F10 que expressam de modo estável ovalbumina de galinha) foram cultivadas em DMEM que contém BBS a 10% vol/vol. Um total de 200.000 células de B16-OVA em 100 µl PBS foi injetada s.c. no flanco direito de camundongos C57BL/6J machos de 8 a 12 semanas de idade para estabelecer tumores (n=8 camundongos por grupo). Para pré-tratamento, 10 mg/kg de Diprovocim-1 ou 2 mg/kg de alume com ou sem OVA (100 µg) foi injetado i.m. em camundongos no mesmo dia que inoculação de tumor (dia 0). Camundongos receberam uma dose intensificadora sete dias após a primeira imunização. Nos dias 3, 6 e 9, alguns grupos foram injetados i.p. com 200 µg de inibidor de ponto de controle (antimPD-L1, BioXcell) em 100 µl de salino.

[00146] Para pós-tratamento, 10 mg/kg de Diprovocim-1 ou 2 mg/kg de alume com OVA (100 µg) foi injetado i.m. em camundongos no dia 3 após a inoculação de tumor. Camundongos receberam uma dose intensificadora sete dias após a primeira imunização. Nos dias 3, 6, 9, 12 e 15 após a inoculação de tumor, camundongos foram também injetados i.p. com 200 µg de antimPD-L1 em 100 µl de salino.

[00147] Para esgotamento de células T CD4, células T CD8, e/ou células NK, 300 µg de antimCD4 (BioXcell), 300 µg de antimCD8 (BioXcell), 300 µg antimNK1.1 (BioXcell), ou os três anticorpos em conjunto em 200 µl de salino foram injetados i.p. em camundongos no dia 0, 3, 6, 9, 12, e 15 após a inoculação de tumor. 10 mg/kg de Diprovocim com OVA (100 µg) ou Veículo foi injetado i.m. em camundongos no dia 3 após a inoculação de tumor. Camundongos receberam uma dose intensificadora sete dias após a primeira imunização. Nos dias 3, 6, 9, 12 e 15 após a inoculação de tumor, camundongos foram também injetados i.p. com 200 µg de antimPD-L1 em 100 µl de salino.

[00148] Tumores foram medidos com um calibrador digital (Fisher) e os tamanhos de tumor foram calculados com uso da seguinte fórmula: $\text{volume} = 0,5 \times \text{comprimento}$

x largura². Camundongos foram sacrificados quando o comprimento ou largura de tumor alcançou 2 cm.

SEPARAÇÃO E MANCHAMENTO DE LEUCÓCITO DE INFILTRAÇÃO DE TUMOR

[00149] Um total de 200.000 células de B16-OVA em 100 µl PBS foi injetado s.c. ao flanco de cada camundongo para estabelecer tumores (n=6 camundongos por tratamento). 10 mg/kg de Diprovocim-1 ou 2 mg/kg de alume com OVA (100 µg) foi injetado i.m. em camundongos no dia 3 após a inoculação de tumor. Camundongos receberam uma dose intensificadora sete dias após a primeira imunização. Nos dias 3, 6, 9, e 12 após a inoculação de tumor, camundongos foram também injetados i.p. com 200 µg de antimPD-L1.

[00150] No dia 14 após a inoculação de tumor, tumores foram coletados, cortados e filtrados através de um manchador de 40-µm para obter suspensões de célula única. Hemácias foram lisadas com tampão de lise de RBC (Sigma). Após a peletização, células foram manchadas com uma mistura de anticorpos por 45 minutos, incluindo CD45.2-PE ou CD45.2-APC anticamundongo (BioLegend), CD3-FITC anticamundongo (BD Biosciences), CD4-BV786 anticamundongo (BD Biosciences), CD8-BV510 anticamundongo (BioLegend), CD44-PE-CF594 anticamundongo (BioLegend), tetrâmero H-2Kb/OVA conjugado por APC (SIINFEKL; SEQ ID NO: XX) (Baylor College of Medicine), F4/80-PE anticamundongo (Tonbo Bioscience), anticamundongo CD11b-BV605 (BioLegend), antiCD11c-BV711 (BD Biosciences), antiNKL1-BV650 (BD Biosciences). Então, as células foram lavadas duas vezes com PBS. Células coloradas foram analisadas com um instrumento LSRII (BD Biosciences) e os dados de citometria de fluxo foram analisados com uso de software FlowJo.

MEDIÇÃO DE INICIAÇÃO CRUZADA DE CÉLULAS T CD8

[00151] Camundongos C57BL/6J machos foram injetadas i.m. com 100 µg de OVA misturado com Veículo ou com 10 mg/kg de Diprovocim(n=4 camundongos por tratamento). 24 horas depois, DCs da drenagem de gânglios linfáticos e baço foram purificadas por Kit de Isolamento de Célula Dendrítica Pan de Camundongo (Miltenyi Biotech). Células T CD8 de camundongos transgênicos de OT-I foram purificados por Kit de Isolamento de Célula CD8+T de Camundongo (Miltenyi Biotech). 300.000 DCs

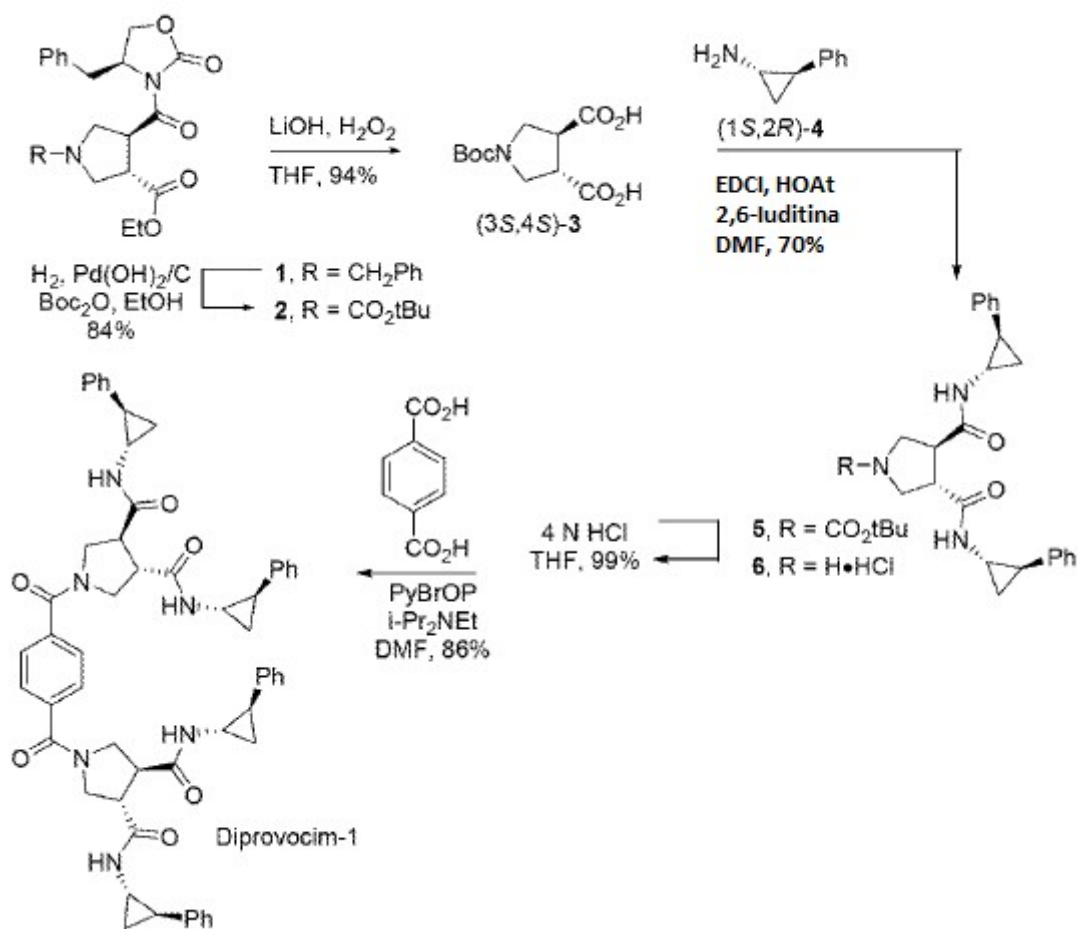
foram cocultivadas com 300.000 células T CD8 de OT-I em meio de RPMI que contém FBS a 10% vol/vol e penicilina 1% vol/vol e estreptomicina por 24 horas. Então, células foram coletadas e manchadas com CD3-FITC anticamundongo, CD8-BV510 anticamundongo e CD69-PE-CF594 anticamundongo (BioLegend) por 45 minutos. Então, as células foram lavadas duas vezes com PBS. Células coloradas foram analisadas com um instrumento LSRII e os dados de citometria de fluxo foram analisados com uso de software FlowJo.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

[00152] Dados representam meio \pm SEM em todos os gráficos que retratam barras de erro. A significância de diferenças entre grupos experimentais foi determinada com uso de GraphPad Prism 7 e dos testes estatísticos indicados. Para comparações de diferenças entre dois grupos experimentais não pareados, um teste T de Estudante não pareado foi usado e valores P de duas caudas são relatados. Valores P são indicados por * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$. $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

MÉTODOS

SÍNTESE DE DIPROVOCIM-1



[00153] As sínteses de moléculas de Diprovocim e intermediários são mostrados e discutidos em detalhes no documento nº WO 2018/005812 1A, publicado em 04 de janeiro de 2018. Sínteses ilustrativas são também definidas abaixo no presente documento.

[00154] 3-Etila 4-((5)-4-Benzil-2-oxooxazolidina-3-carbonil)pirrolidina-1,3-dicarboxilato de (3S,4S)-1-terc-Butila (2). 1-benzil-4-((5)-4-benzil-2-oxooxazolidina-3-carbonil)pirrolidina-3-carboxilato de (3S, 4S)-Etila¹ (1, 3,43 g, 7,86 mmol) e Boc₂O (1,80 g, 8,25 mmol, 1,05 equiv) foram dissolvidos em etanol (EtOH, 50 ml) em temperatura ambiente. Pd(OH)₂/C (500 mg) foi adicionado e a mistura de reação foi aspergida com nitrogênio (N₂) por 15 minutos.

[00155] Um adaptador de lavagem tridirecional, equipado com um balão preenchido com hidrogênio (H₂) e fonte de vácuo, foi fixado. O headspace acima da mistura de

reação foi evacuado até que o solvente começasse a ferver, então preenchido com H₂. Esse processo de vácuo/enchimento foi repetido 10 a 15 vezes para maximizar H₂ no headspace. Após agitação por 18 horas, a mistura de reação foi filtrada através de um tampão de Celite de 6 cm, enxague com alíquotas de EtOH (3 x 15 ml) cuidadosamente, e concentrada. Cromatografia de coluna flash (SiO₂, EtOAc/hexanos a 25%) forneceu 2,93 g (84%) de 2 como um óleo viscoso claro.

¹ Preparado como um estereoisômero único de acordo com: Bao et al., patente nº U.S. 6.489.354 B1.

[00156] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,40 a 7,19 (m, 5H), 4,69 (dd, J = 9,0, 4,5 Hz, 1H), 4,52 (q, J = 7,7 Hz, 1H), 4,29 a 4,14 (m, 4H), 3,95 a 3,75 (m, 2H), 3,60 (m, 2H), 3,52 a 3,27 (m, 2H), 2,86 a 2,71 (m, 1H), 1,46 (s, 9H), 1,28 (t, J = 7,5 Hz, 3H). HRMS (ESI-TOF) m/z calcd para C₂₃H₃₁N₂O₇ [M+H]⁺ 447.2126, encontrou 447.2126.

[00157] Ácido (3S,4S)-1-(terc-Butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-dicarboxílico (3).² 4-((5)-4-benzil-2-oxooxazolidina-3-carbonil)-pirrolidina-1,3-dicarboxilato de (3S, 4S)-1-terc-Butil3-etila ((3S,4S)-2, 2,06 g, 4,63 mmol) foi dissolvido em tetraidrofurano anidro (THF, 20 ml) e resfriado a 0 °C. Peróxido de hidrogênio (2,10 ml, ca. 18,5 mmol, 4,0 equiv, 30% p/v) foi adicionado em gotas à solução de reação reagida. Após 3 a 5 minutos, LiOH•H₂O (500 mg, 11,9 mmol) foi adicionado. Após 2 horas, LiOH adicional (470 mg, 11,2 mmol) foi adicionado, junto com H₂O (10 ml) e THF (15 ml).

[00158] A mistura de reação de THF aquosa foi agitada 3 horas, aquecendo à temperatura ambiente. Na₂SO₃ aquoso saturado (10 ml) foi adicionado, e o THF foi removido sob uma corrente de N₂. A mistura resultante foi despejada em H₂O (200 ml) e extraída com cloreto de metileno (CH₂Cl₂/ 2 x 100 ml) para remover a oxazolidinona.

² Procedimento modificado de: Ma et al., *Tetrahedron Asymm.* 8, 883 a 887 (1997).

[00159] A fase aquosa foi acidificada com a adição de 1 N HCl a pH 2 aquoso (ca. 75 ml). A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (EtOAc, 3 x 125 ml), e os extratos orgânicos foram secos em Na₂SO₄, filtrado e concentrado para fornecer 1,13 g (94%) de (S, S)-3 como um sólido branco, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 3,59 a 3,48 (m, 2H), 3,41 a 3,31 (m, 2H), 3,30 a 3,18 (m, 2H), 1,39 (s, 9H).

[00160] 3,4-Bis ((1S, 2R)-2-fenilciclopropil)carbamoil)pirrolidina-1-carboxilato de

(3S, 4S) -terc-Butila (5). Ácido (3S,4S)-1-(terc-Butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-dicarboxílico ((S,S)-3, 775 mg, 2,99 mmol), (1S,2R)-trans-2-fenilciclopropilamina ((1S,2R)-4, 816 mg, 6,13 mmol, 2,05 equiv, comercialmente disponível de D-L Chiral Chemicals), e 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt, 895 mg, 6,58 mmol, 2,20 equiv) foram dissolvidos em dimetilformamida anidra (DMF, (15 ml) sob uma atmosfera de N₂. 2,6-Lutidina (1,75 ml, 14,9 mmol, 5,00 equiv) foi adicionado lentamente. Mediante dissolução dos reagentes (cerca de 15 minutos), cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI • HCl, 1,43 g, 7,47 mmol, 2,50 equiv) foi adicionado em uma porção, e a mistura de reação foi agitada por 18 horas, depois do qual, a mesma foi despejada em 1 N HCl (150 ml) aquoso e EtOAc (100 ml).

[00161] A fase aquosa foi extraída com EtOAc (2 x 75 ml), e as fases orgânicas combinadas foram lavada com 1 N HCl aquoso (75 ml), NaHCO₃ aquoso saturado (75 ml), e NaCl aquoso saturado (50 ml) sequencialmente. A fase orgânica foi seca em Na₂SO₄, filtrada e concentrada. Cromatografia de coluna flash (SiO₂, EtOAc/hexanos a 50%) forneceu 1,02 g (70%) de 5.

[00162] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,33 a 7,24 (m, 5H) , 7,23 a 7,09 (m, 5H) , 6,61 (s, 1H), 6,43 (s, 1H), 3,85 (t, J = 9,7 Hz, 1H), 3,68 (m, 1H), 3,60 (t, J= 10,5 Hz, 1H) , 3,42 (t, J = 10,4 Hz, 1H) , 3,27 (q, J= 10,0, 9,3 Hz, 1H), 3,12 (t, J= 9,7 Hz, 1H), 2,88 (m, 2H), 2,05 (ddt, J= 9,8, 6,4, 3,4 Hz, 2H), 1,46 (s, 9H), 1,24 (q, J= 6,6 Hz, 2H) , 1,13 (dt, J= 10,1, 5,3 Hz, 2H) . HRMS (ESI-TOF) m/z calcd para C₂₉H₃₆N₃O₄ [M+H]⁺ 490,2700, encontrou 490,2705.

[00163] Cloridrato de (3S, 4S) – N³, N⁴ -Bis ((1S, 2R) -2-fenil-ciclopropil)pirrolidina-3,4-dicarboxamida (6). 3,4-bis(((1S,2S)-2-fenilciclopropil)carbamoil)-pirrolidina-1-carboxilato de (3S,4S)-terc-Butila (5, 998 mg, 2,04 mmol) foi suspensa em THF anidro (2 ml) em temperatura ambiente. 4 N HCl (8 ml, 4,0 M de solução em dioxano) foi adicionado em gotas à solução de reação vigorosamente reagida. Após agitação por 3 horas em temperatura ambiente, durante a qual uma parte do produto fora precipitado da mistura de reação, os solventes foram removidos por corrente de N₂ por 16 horas. Os sólidos residuais foram suspensos em THF anidro e reconcentrado in vacuo (3x5 ml) para garantir a remoção completa do dioxano e HCl em excesso.

Esse processo foi repetido com Et₂O anidro (3*5 ml) para fornecer 870 mg (99%) de 6 como um sólido branco amorfo.

[00164] ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9,35 (s, 2H) , 8,76 (d, J = 4,4 Hz, 2H), 7,26 (t, J= 1,6 Hz, 4H) , 7,20 a 7,06 (m, 6H) , 3,76 a 3,62 (m, 1H), 3,55 a 3,42 (m, 1H) , 3,26 (t, J = 8,2 Hz, 2H) , 3,21 a 3,11 (m, 2H), 2,90 a 2,78 (m, 2H), 1,99 (ddd, J = 9,6, 6,3, 3,4 Hz, 2H) , 1,26 a 1,13 (m, 4H). HRMS (ESI-TOF) m/z calcd para C₂₄H₂₈N₃O₂ [M+H]⁺ 390,2176, encontrou 390,2178.

[00165] Diprovocim-1: (3S,3'S,4S, 4'S)-1,1'-Tereftaloilbis{N^J r Δ^Λ-bis((1S,2R)-2-fenilciclo-propil)pirrolidina-3,4-dicarboxamida) . Cloridrato de (3S,4S)-N³, N⁴-Bis((1S,2R)-2-fenilciclopropil)-pirrolidina-3,4-dicarboxamida (6, 500 mg, 1,17 mmol, 2,20 equiv) e ácido tereftálico (ácido benzeno-1,4-dicarboxílico, 89 mg, 0,53 mmol, 1,00 equiv) foram dissolvidos em DMF anidro (6 ml) em temperatura ambiente. i-Pr₂NEt (0,280 ml, 1,60 mmol, 3,00 equiv) foi adicionado, seguido por hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrol idinofosfônio (PyBrOP, 497 mg, 1,07 mmol, 2,00 equiv) após 5 minutos e a mistura foi agitada a 23 °C por 18 horas. Após 18 horas, a mistura de reação foi diluída com EtOAc (300 ml) e lavada com aquoso 0,5 N HCl (2 x 150 ml). A fase aquosa foi extraída com EtOAc (1 x 50 ml).

[00166] As fases orgânicas combinadas foram lavadas com NaHCO₃ aquoso saturado, (100 ml) e NaCl aquoso saturado(75 ml). A fase orgânica foi seca em Na₂SO₄, decantada e concentrada. Cromatografia de coluna flash (SiO₂, MeOH/CH₂Cl₂ a 5 a 8%) forneceu Diprovocim-1. Diprovocim-1 poderia ser adicionalmente purificada por trituração com 1:1 Et₂O/EtOAc (3x5 ml) fria (0 °C), decantação da fase líquida para fornecer 421 mg 26 (86%) de diprovocim puro. [α]_D²⁶ +57 (c 0,33, EtOH) . IR (puro) ν_{max} 3259, 1633, 1539, 1426, 1386, 1073, 695 cm⁻¹ .

[00167] NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 8,42 (d, J = 4,3 Hz, 2H) , 8,29 (d, J= 4,3 Hz, 2H), 7,56 (s, 4H), 7,27 a 7,21 (m, 8H), 7,19 a 7,09 (m, 8H), 7,09 a 7,03 (m, 4H), 3,80 (dd, J = 12,0, 8,6 Hz, 2H), 3,71 a 3,58 (m, 2H), 3,51 (ddd, J= 15,6, 11,2, 8,2 Hz, 4H) , 3,19 (q, J = 8,4 Hz, 2H) , 3,10 (q, J= 8,1 Hz, 2H) , 2,90 a 2,80 (m, 2H), 2,80 a 2,73 (m, 2H), 1,97 (ddd, J = 9,6, 6,4, 3,4 Hz, 2H), 1,86 (ddd, J = 9,5, 6,3, 3,4 Hz, 2H) , 1,21 a 1,13 (m, 4H) , 1,13 a 1,05 (m, 4H) . ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ 171,65, 170,93,

167,46, 141,28, 141,19, 137,71, 128,17, 128,14, 127,09, 125,83, 125,79, 125,60, 51,48, 48,74, 46,95, 45,83, 45,07, 32,54, 32,45, 25,87, 23,90, 23,81, 15,33, 15,24. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd para C₅₆H₅₇N₆O₆ [M+H]⁺ 909,4334, encontrou 909,4334.

CITAÇÕES

1. Hou B, Reizis B & DeFranco AL (2008) Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and - extrinsic mechanisms. *Immunity* 29(2): 272 a 282.
2. MacLeod H & Wetzler LM (2007) T cell activation by TLRs: A role for TLRs in the adaptive immune response. *Sci STKE* 2007(402) : pe48.
3. Coffman RL, Sher A & Seder RA (2010) Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity* 33(4): 492 a 503.
4. Haanen JBAG (2017) Converting cold into hot tumors by combining immunotherapies. *Cell* 170(6): 1055 a 1056.
5. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA & Ribas A (2017) Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell* 168(4) : 707 a 723.
6. Wang H, et al (2017) cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(7): 1637 a 1642.
7. Zou W, Wolchok JD & Chen L (2016) PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med* 8(328) : 328rv4.
8. Topalian SL, Drake CG & Pardoll DM (2015) Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 27(4): 450 a 461.
9. Takeda Y, et al (2017) A TLR3-specific adjuvant relieves innate resistance to PD-L1 blockade without cytokine toxicity in tumor vaccine immunotherapy. *Cell Rep* 19(9): 1874 a 1887.
10. Shah RR, Hassett KJ & Brito LA (2017) Overview of vaccine adjuvants: Introduction, history, and current status. *Methods Mol Biol* 1494: 1 a 13.
11. Reed SG, Orr MT & Fox CB (2013) Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med* 19(12): 1597 a 1608.

12. Kawai T & Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol* 11(5): 373 a 384.
13. Kawasaki T & Kawai T (2014) Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5: 461.
14. Beutler BA (2009) TLRs and innate immunity. *Blood* 113(7): 1399 a 1407.
15. Lira KH & Staudt LM (2013) Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(1): a011247.
16. Wang S, et al (2016) Intratumoral injection of a CpG oligonucleotide reverts resistance to PD-1 blockade by expanding multifunctional CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(46): E7240 a E7249.
17. Dowling JK & Mansell A (2016) Toll-like receptors: The swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clin Transl Immunology* 5(5): e85.
18. Goldberg J, et al (2002) Erythropoietin mimetics derived from solution phase combinatorial libraries. *J Am Chem Soc* 124(4): 544 a 555.
19. Ueha S, et al (2015) Robust antitumor effects of combined anti-CD4-depleting antibody and anti-PD-1/PD-L1 immune checkpoint antibody treatment in mice. *Cancer Immunol Res* 3(6): 631 a 640.
20. Lechner MG, et al (2013) Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. *J Immunother* 36(9): 477 a 489.
21. Chen L, et al (1994) Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 179(2): 523 a 532.
22. Murgueitio MS, et al (2017) Enhanced immunostimulatory activity of in silico discovered agonists of toll-like receptor 2 (TLR2). *Biochim Biophys Acta* 1861(11 Pt A): 2680 a 2689.
23. Guo X, et al (2017) The novel toll-like receptor 2 agonist SUP3 enhances antigen presentation and T cell activation by dendritic cells. *Front Immunol* 8: 158.
24. Guan Y, Omueti-Ayoade K, Mutha SK, Hergenrother PJ & Tapping RI (2010) Identification of novel synthetic toll-like receptor 2 agonists by high throughput

screening. *J Biol Chem* 285(31): 23755 a 23762.

25. Cheng K, et al (2015) Specific activation of the TLR1-TLR2 heterodimer by smallmolecule agonists. *Sci Adv* 1(3): 10.1126/sciadv.1400139.

26. Jin MS, et al (2007) Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130(6): 1071 a 1082.

27. Freeman GJ, et al (2000) Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192 (7): 1027 a 1034.

28. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N & Honjo T (1999) Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11(2): 141 a 151.

29. Dong H, Zhu G, Tamada K & Chen L (1999) B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5(12): 1365 a 1369.

30. Tang M, et al (2015) Toll-like receptor 2 activation promotes tumor dendritic cell dysfunction by regulating IL-6 and IL-10 receptor signaling. *Cell Rep* 13(12): 2851 a 2864.

31. Yamazaki S, et al (2011) TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides in vivo. *PLoS One* 6(4): e18833.

32. Shime H, et al (2017) Toll-like receptor 2 ligand and interferon-gamma suppress antitumor T cell responses by enhancing the immunosuppressive activity of monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* 7(1): 61373231.

33. Shen KY, et al (2014) Molecular mechanisms of TLR2-mediated antigen crosspresentation in dendritic cells. *J Immunol* 192(9): 4233 a 4241.

34. Nyirenda MH, et al (2011) TLR2 stimulation drives human naive and effector regulatory T cells into a Th17-like phenotype with reduced suppressive function. *J Immunol* 187(5): 2278 a 2290 .

35. Zhang Y, et al (2011) TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. *J Immunol* 186(4): 1963 a

1969.

36. Amiset L, et al (2012) TLR2 ligation protects effector T cells from regulatory T-cell mediated suppression and repolarizes T helper responses following MVA-based cancer immunotherapy. *Oncolmmunology* 1(8): 1271 a 1280.

[00168] Cada um dentre as patentes, pedidos de patente e artigos citados no presente documento é incorporado a título de referência.

[00169] A descrição a seguir e os exemplos são destinados a serem ilustrativos e não devem ser tomados como limitadores. Ainda outras variações dentro do espírito e escopo da invenção são possíveis e se apresentarão prontamente por si só aos elementos versados na técnica.

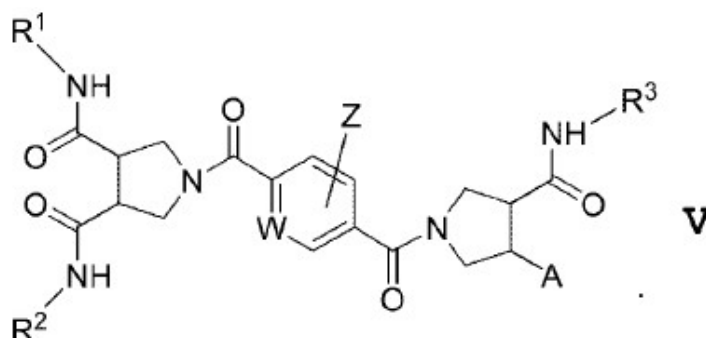
REIVINDICAÇÕES

1. Método para inibir o desenvolvimento de células doentes em um mamífero, em que as células doentes apresentam uma molécula marcadora que está ausente nas células do mesmo tipo que estão livres da dita doença ou está presente nas células livres da doença em números reduzidos significativamente comparado às ditas células doentes, caracterizado por compreender as etapas de:

a) administrar ao dito mamífero (i) uma quantidade suficiente de adjuvante de um composto de Diprovocim, (ii) uma quantidade estimuladora de célula T de um inibidor do ponto de controle imunológico, e (iii) uma quantidade imunizante da dita molécula marcadora ou porção da mesma;

b) manter o dito mamífero imunizado durante um período de tempo suficiente para o dito mamífero montar uma resposta imune à dita imunização; e

em que o dito composto de Diprovocim corresponde em estrutura à Fórmula estrutural V,



em que

-A é -H (hidrido) ou -C(O)NH-R⁴;

R¹, R², R³ e R⁴ são os mesmos ou diferentes e são uma 2-(4-fluorofenil)etila, uma trans-2-fenilciclopropila, uma trans-2-(4-fluorofenil)-ciclopropila ou um grupo de hidrocarbila C₂-C₁₈ com as condições de que:

1) pelo menos dois de R¹, R², R³ e R⁴ (R¹⁻⁴) ou pelo menos dois de R¹, R² e R³ (R¹⁻³) são uma trans-2-fenilciclopropila, um grupo de trans-2-(4-fluorofenil)-ciclopropila ou uma mistura dos mesmos, ou cada um de um grupo de 2-(4-fluorofenil)etila,

2) pelo menos um grupo de pirrolidinildicarboxamido representado tem a

configuração (S, S), e cada substituinte de R representado diferente de um grupo de hidrocarbila C₂-C₁₈ é uma trans-2-fenilciclopropila, um grupo de trans-2-(4-fluorofenil)-ciclopropila ou uma mistura dos mesmos quando cada um de R¹⁻⁴ é diferente de 2-(4-fluorofenil)etila,

3) não mais do que dois de R¹⁻⁴ são grupos de hidrocarbila C₂-C₁₈ quando -A é -C(O)NH-R⁴, e

4) quando A é hidrido, um de R¹⁻³ pode ser um grupo de hidrocarbila C₂-C₁₈ e o grupo de pirrolidinilcarboxamido contendo R³ representado pode ter ou as configurações R ou S, ou uma mistura de ambas configurações;

-Z é um ou mais de halogênio -H, -NH₂, -OH, -OCH₃, -NO₂, -OCH₂CO₂H, -O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONH(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -NHCOCH₂O-(CH₂CH₂O)_nCH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCHCO₂H(CH₂CO₂H), -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH[(CH₂)₄NH₂]CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CH₂OH)CO{NHCH[(CH₂)₄NH₂]CO}_mNHCH-[(CH₂)₄NH₂]CO₂H (SEQ ID NOs: 3 a 8), -OCH₂CONHCH₂CO{NHCH[(CH₂)₄NH₂]CO}_pNHCH[(CH₂)₄NH]CO₂H (SEQ ID NOs: 9 a 13) e -OCH₂CONHCH₂CO{NHCH(CH₂OH)CO}_qNHCH(CH₂OH)CO₂H (SEQ ID NOs: 14 a 18);

W é nitrogênio (N) ou CH;

"n" é um número cujo valor médio é um a cerca de oito;

"m" é um número cujo valor é de 1 a cerca de 6;

"p" é um número cujo valor é de 1 a cerca de 6; e

"q" é um número cujo valor é de 1 a cerca de 6.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito composto de Diprovocim, o inibidor do ponto de controle imunológico, e a molécula marcadora são administrados dissolvidos ou dispersos em uma composição farmacêutica imunizante.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que

o dito composto de Diprovocim, o inibidor do ponto de controle imunológico, e a molécula marcadora ou porção da mesma são administrados dissolvidos ou dispersos em composições farmacêuticas imunizantes separadas.

4. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o dito composto de Diprovocim e a molécula marcadora ou a porção da mesma são administrados dissolvidos ou dispersos a partir da mesma composição farmacêutica imunizante.

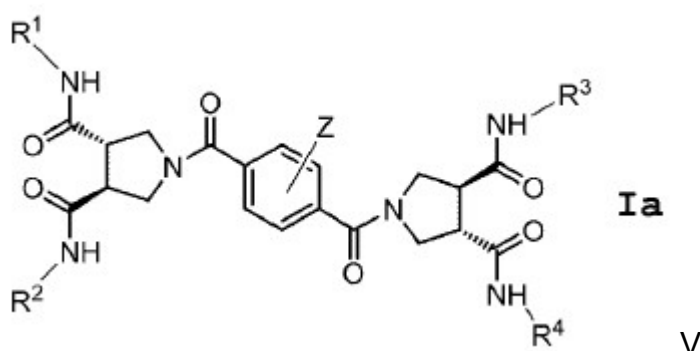
5. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o dito composto de Diprovocim, o inibidor do ponto de controle imunológico, e a molécula marcadora ou a porção da mesma são administrados juntos dissolvidos ou dispersos a partir da mesma composição farmacêutica imunizante.

6. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a dita composição imunizante é um meio aquoso.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito inibidor do ponto de controle imunológico é uma molécula contendo parátopo.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os substituintes de cada grupo de pirrolidinildicarboxamido representado na Fórmula V tem a configuração (S,S).

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que W é CH, o dito composto de Diprovocim tem a Fórmula estrutural Ia, e em que as porções R¹⁻⁴ e Z são



como descrito acima.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de

que -Z é -H.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que cada um de R¹⁻⁴ é um grupo de trans-2-fenilciclopropila ou um grupo de trans-2-(4-fluorofenil)ciclopropila que tem a configuração (1S,2R).

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as ditas células doentes são cancerosas ou infectadas com patógenos.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que as ditas células doentes são células tumorais sólidas cancerosas.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a dita molécula marcadora é um ou mais de CD96, CD20, DLL4, CD55, TIM-3, CXCR1, CD54, CD114, LGR5, CD105, CD56, CD13, CD271, CD34, CXCR4, CD26, CD117, CD10, CD146, Notch2, CD49f, CD24, ABCG2, PODXL-2, Cripto-1, CD326, CD90, CD133, SSEA1, TRA-1-81, TRA-1-60, SSEA4, SSEA3, CD151, CD340 e CD44.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que as ditas células tumorais sólidas cancerosas são selecionadas do grupo que consistem em uma ou mais das células de osteosarcoma, células do sarcoma de Kaposi, células do melanoma, células de câncer de próstata, células de glioblastoma, células do carcinoma de pulmão de célula pequena, células de câncer de mama, células de câncer do fígado, células de câncer do cólon, células de câncer do ovário, células de câncer renal, células de câncer gástrico, células do neuroblastoma, células de câncer pancreático, e linfoma de Hodgkin .

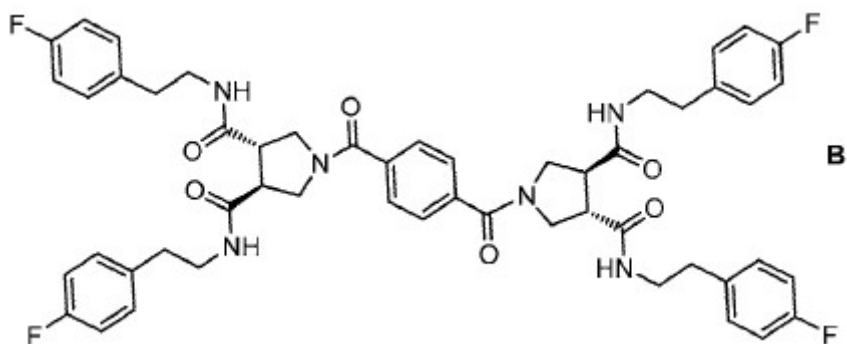
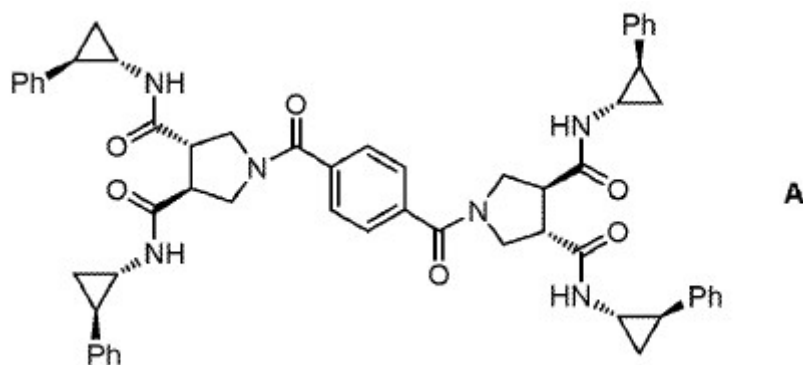
16. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que as ditas células doentes estão infectadas com patógenos.

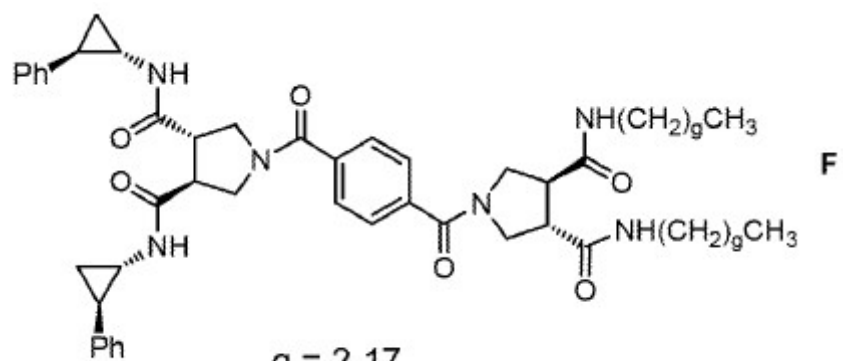
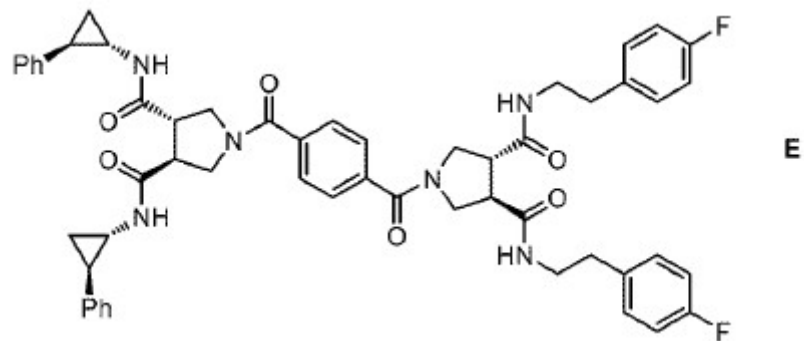
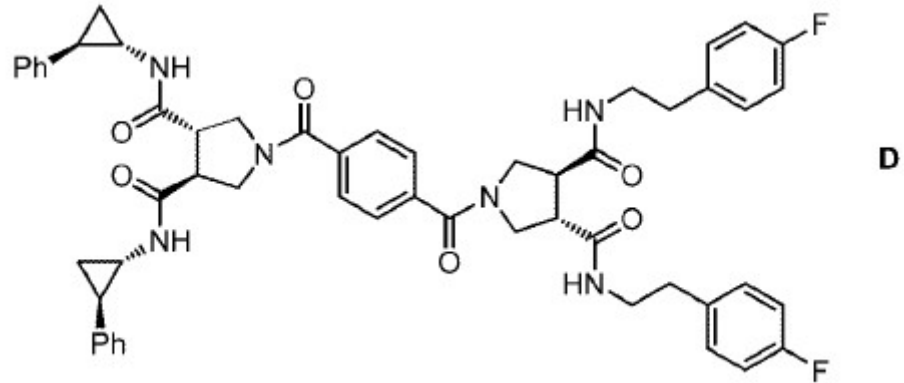
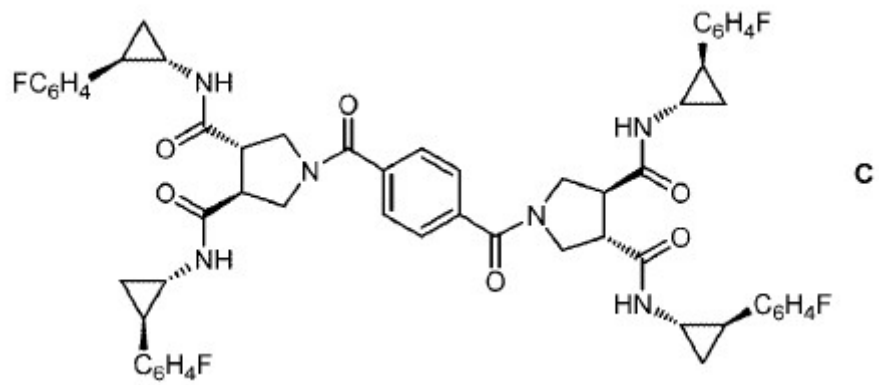
17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o patógeno infectante é um ou mais de um vírus, uma bactéria, um fungo, e um parasita unicelular.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a dita molécula marcadora é uma ou mais da proteína circunsporozoítica de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. bergerii* ou *P. yoelli*; a proteína M2e, proteína hemaglutinina ou

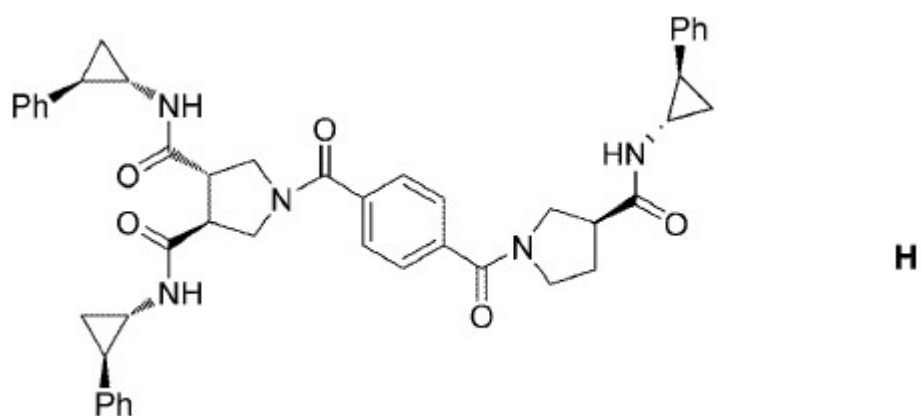
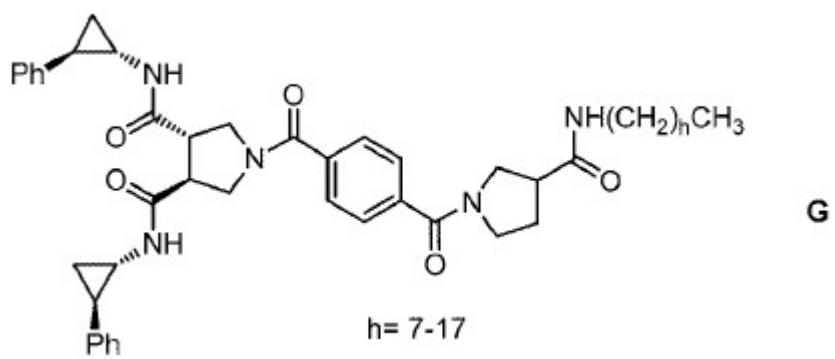
proteína neuraminidase do vírus influenza.

19. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito composto de Diprovocim tem uma fórmula estrutural selecionada do grupo que consiste em um ou mais das Fórmulas A, B, C, D, E, F, G, H e I





$g = 2-17$



e

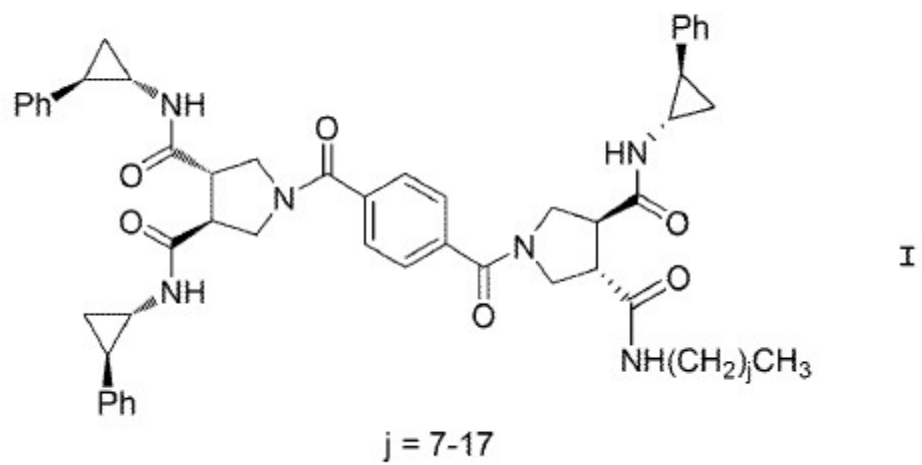


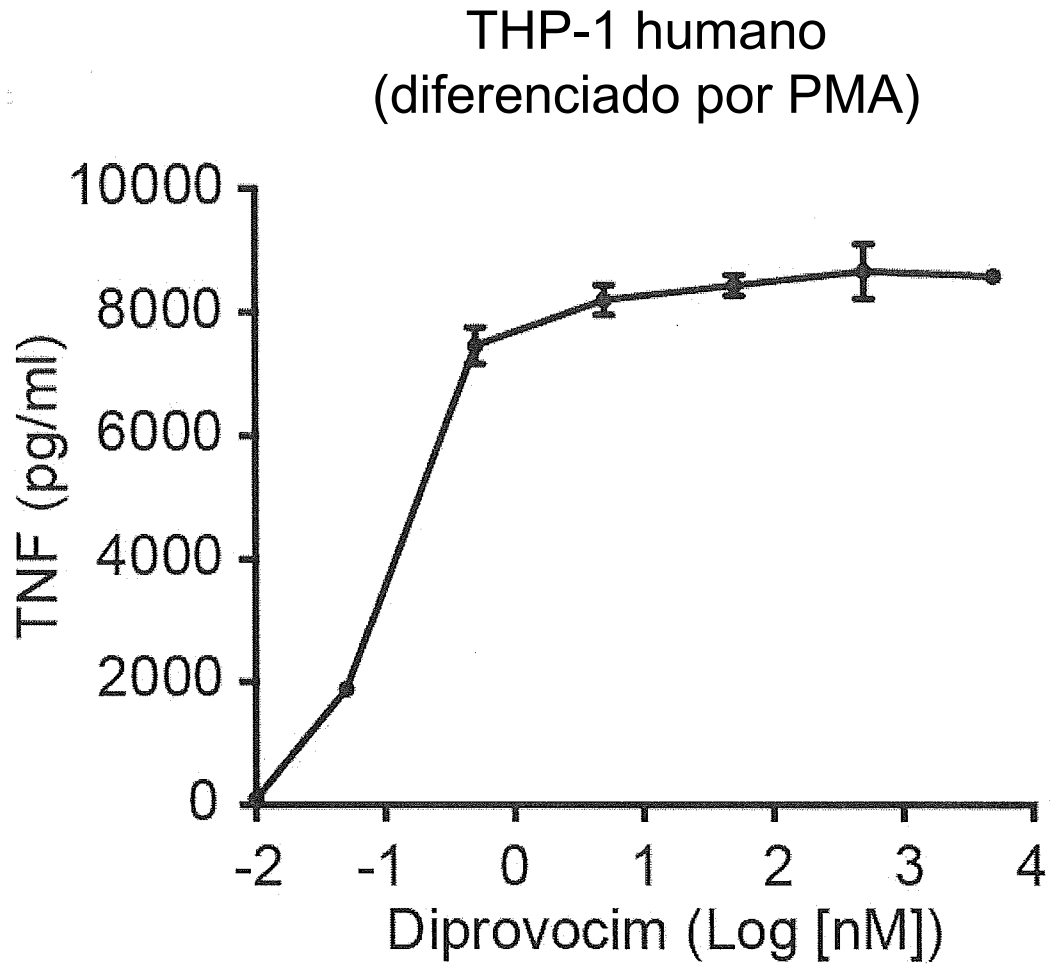
FIGURA 1A

FIGURA 1B

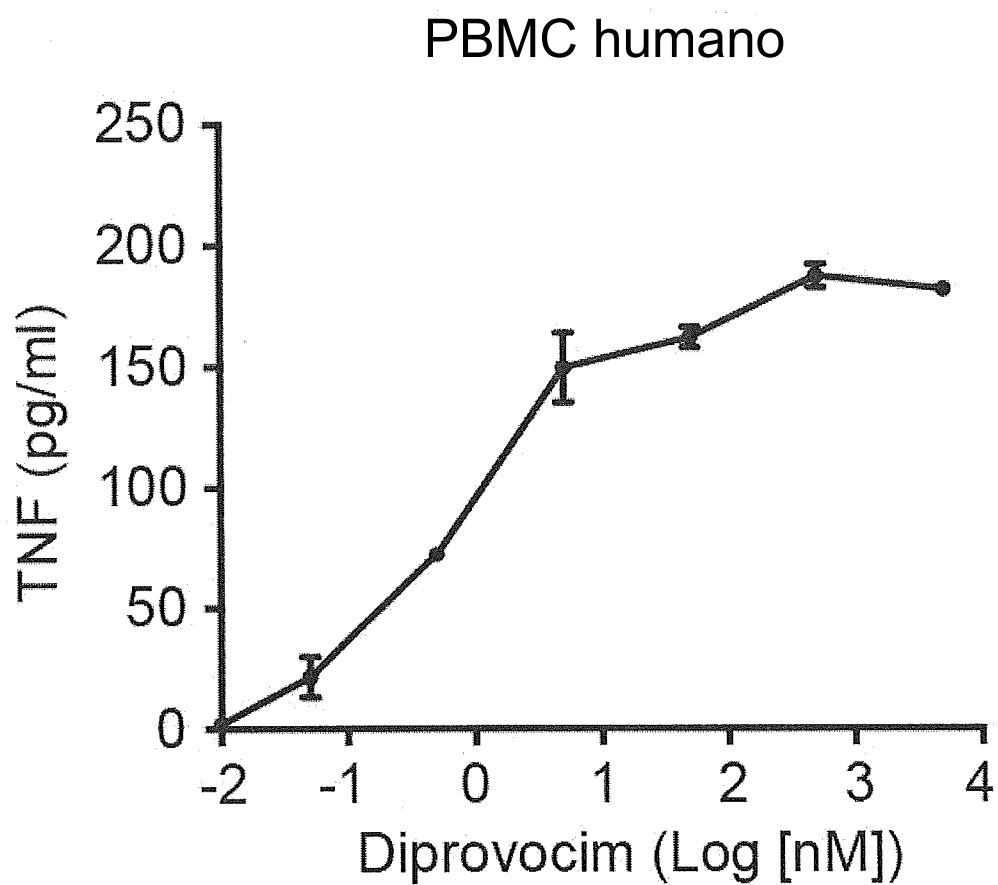


FIGURA 1C

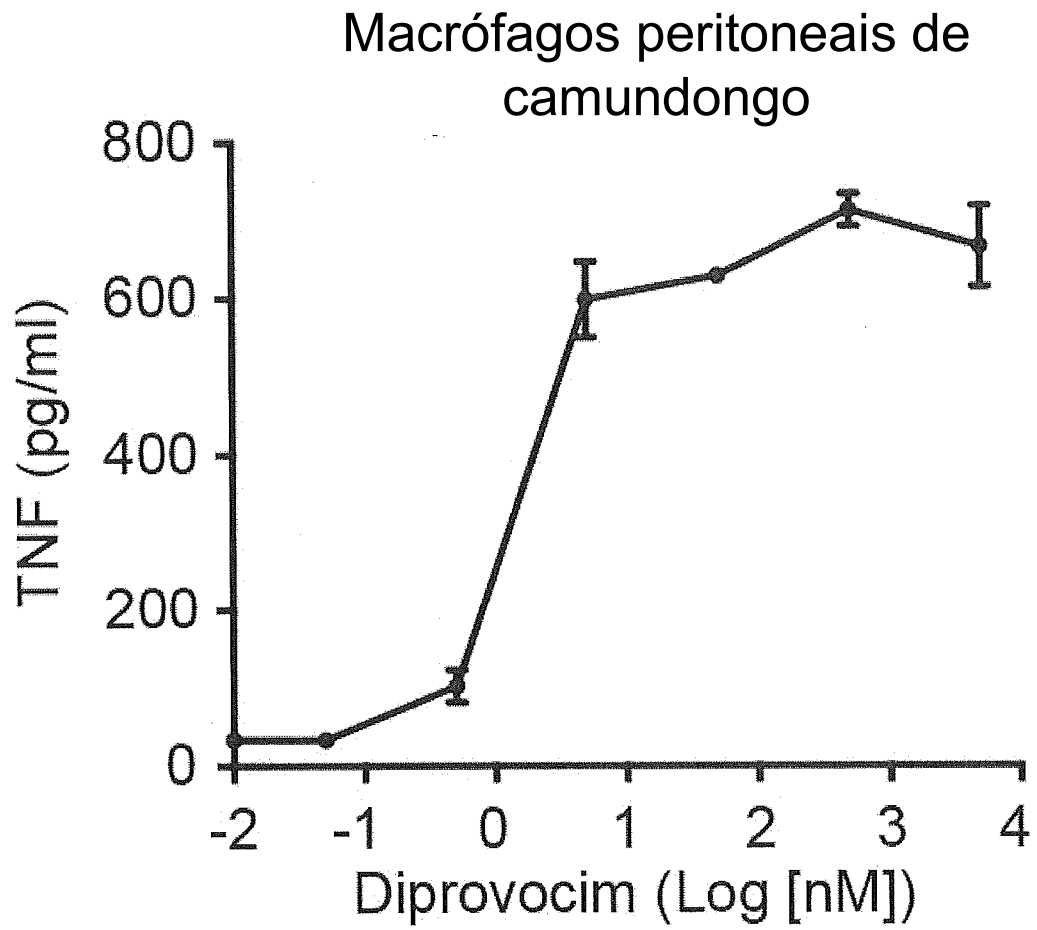


FIGURA 1D

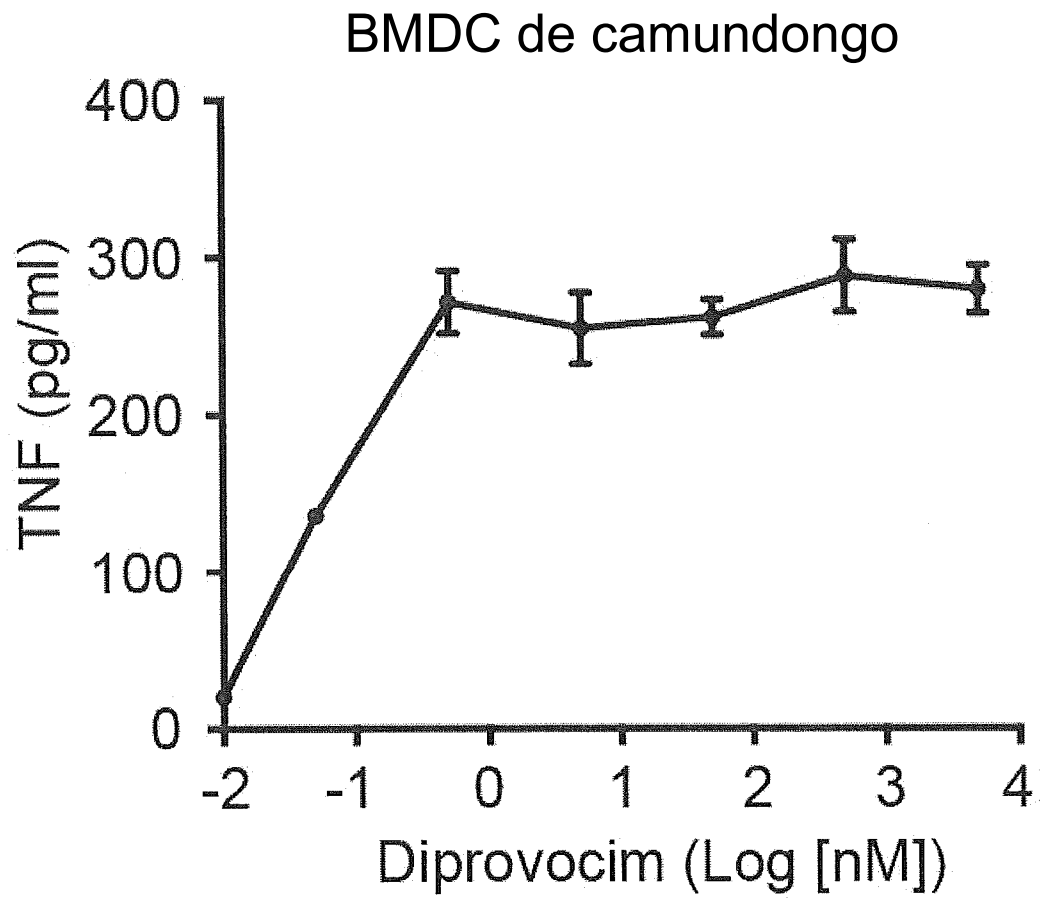


FIGURA 1E

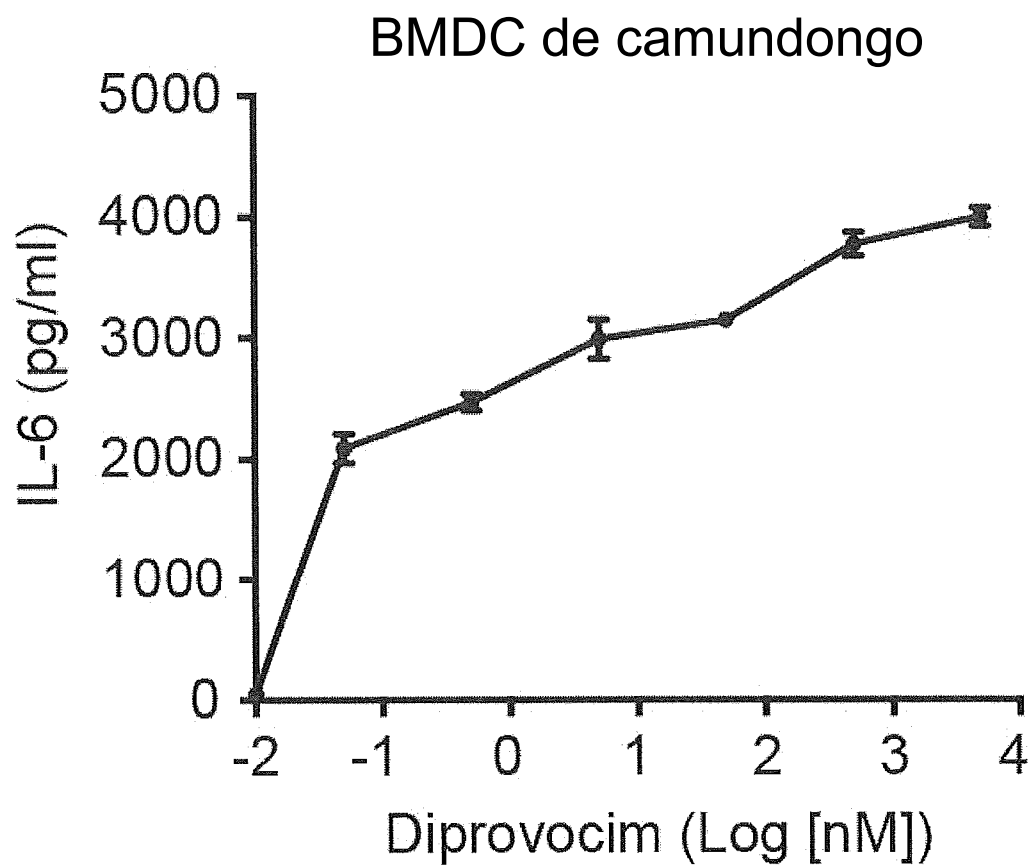


FIGURA 2A

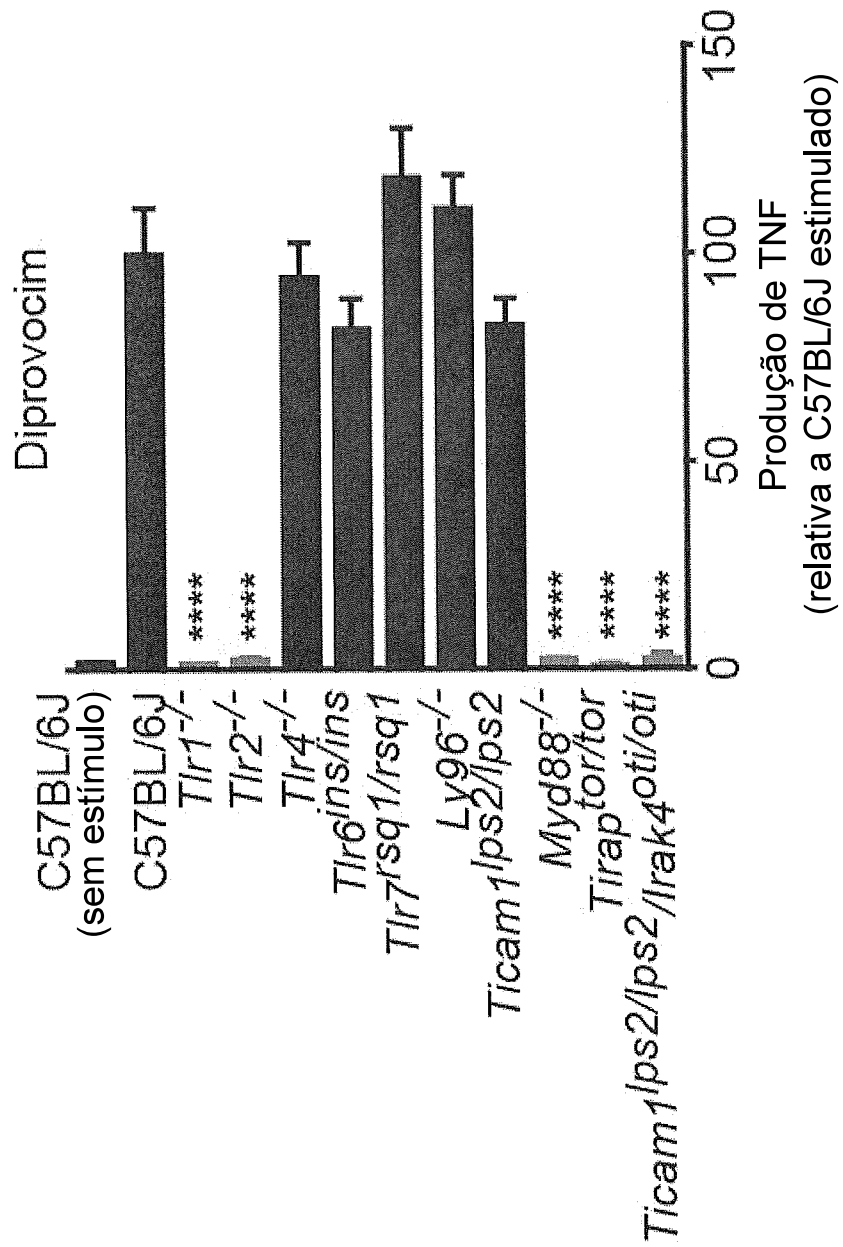


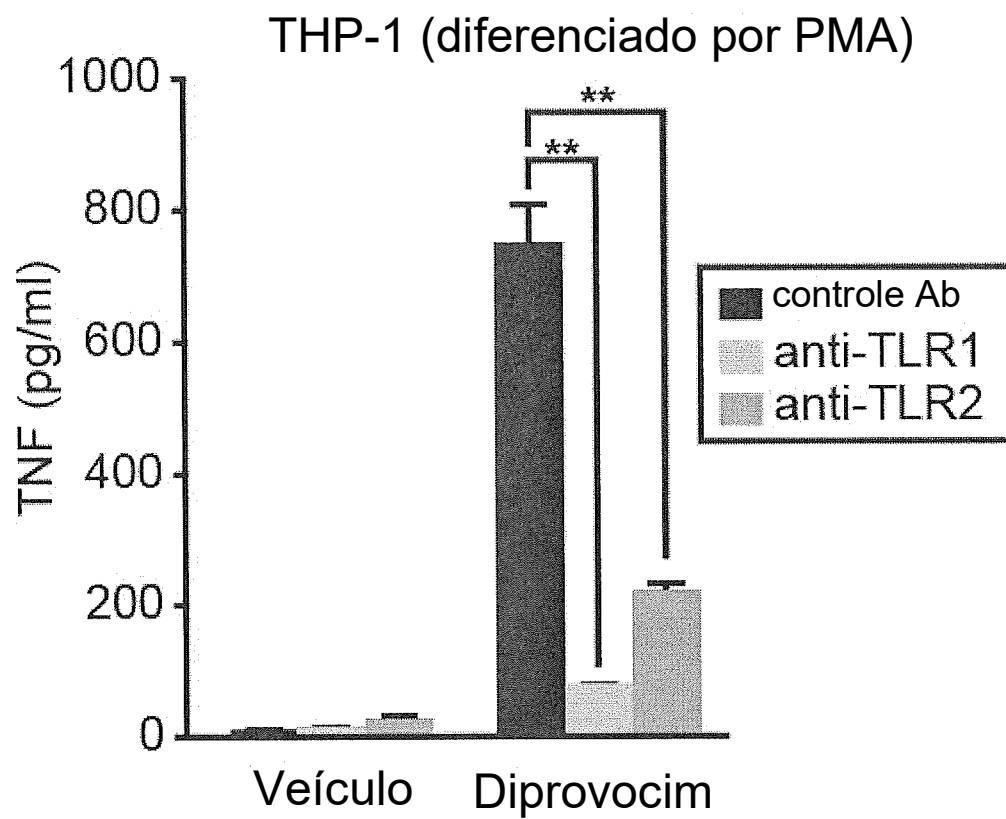
FIGURA 2B

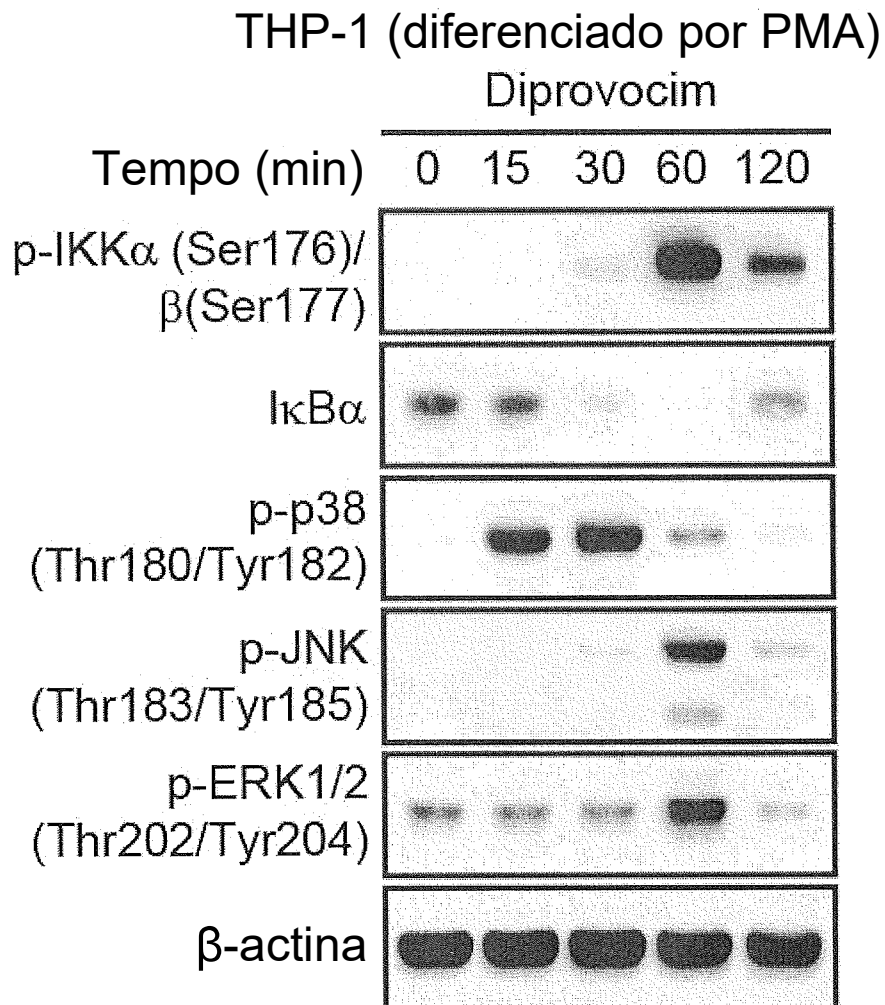
FIGURA 2C

FIGURA 2D

Macrófagos peritoneais de camundongo

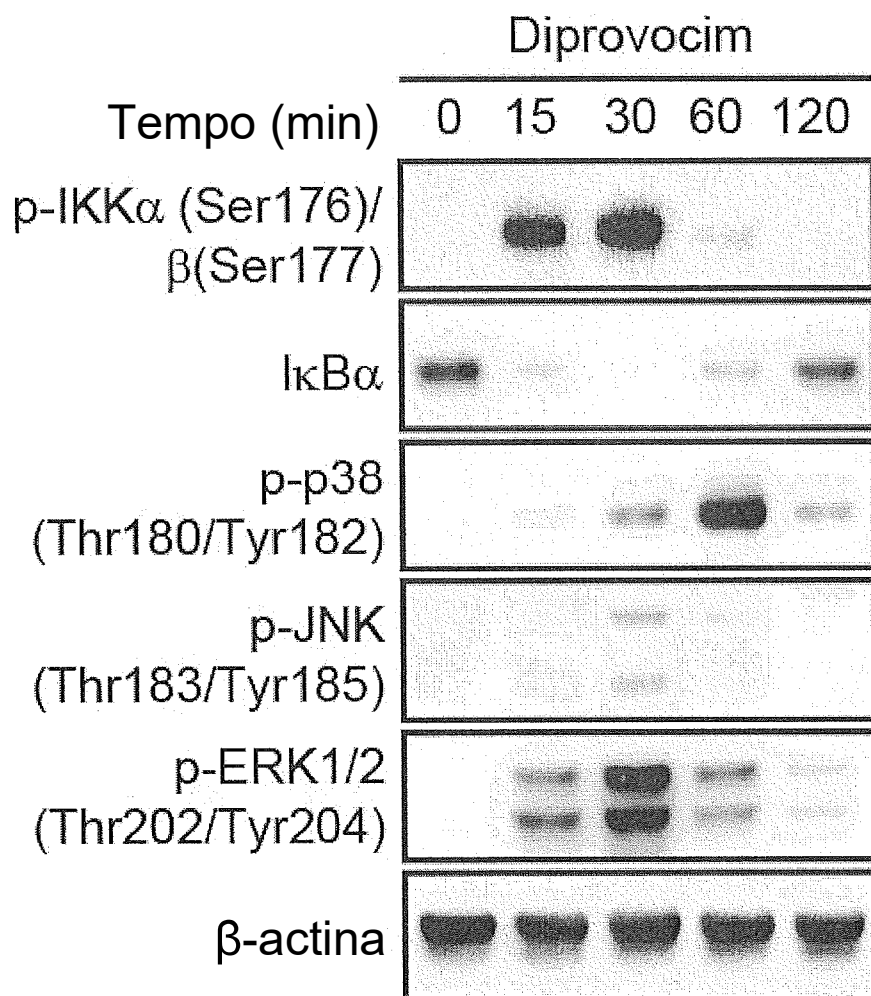


FIGURA 3A

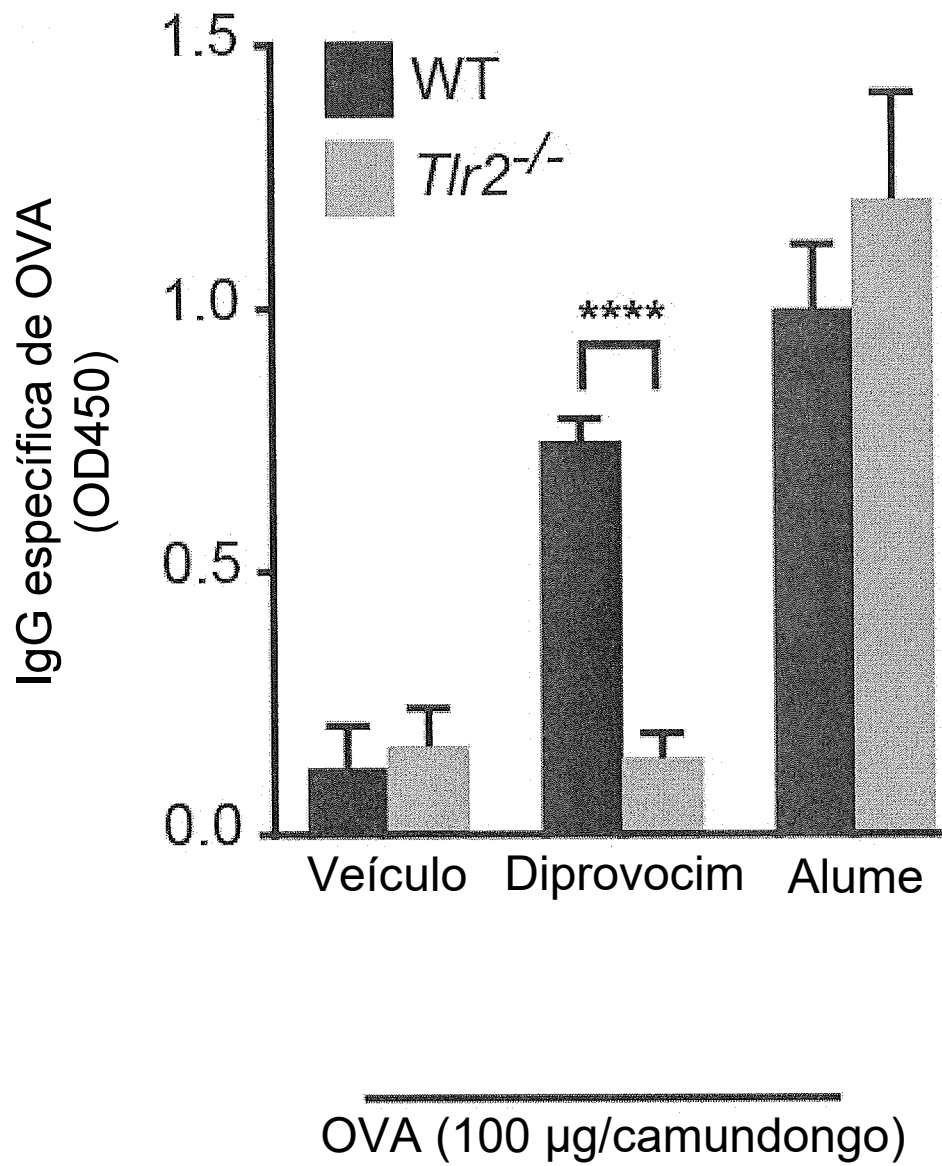


FIGURA 3B

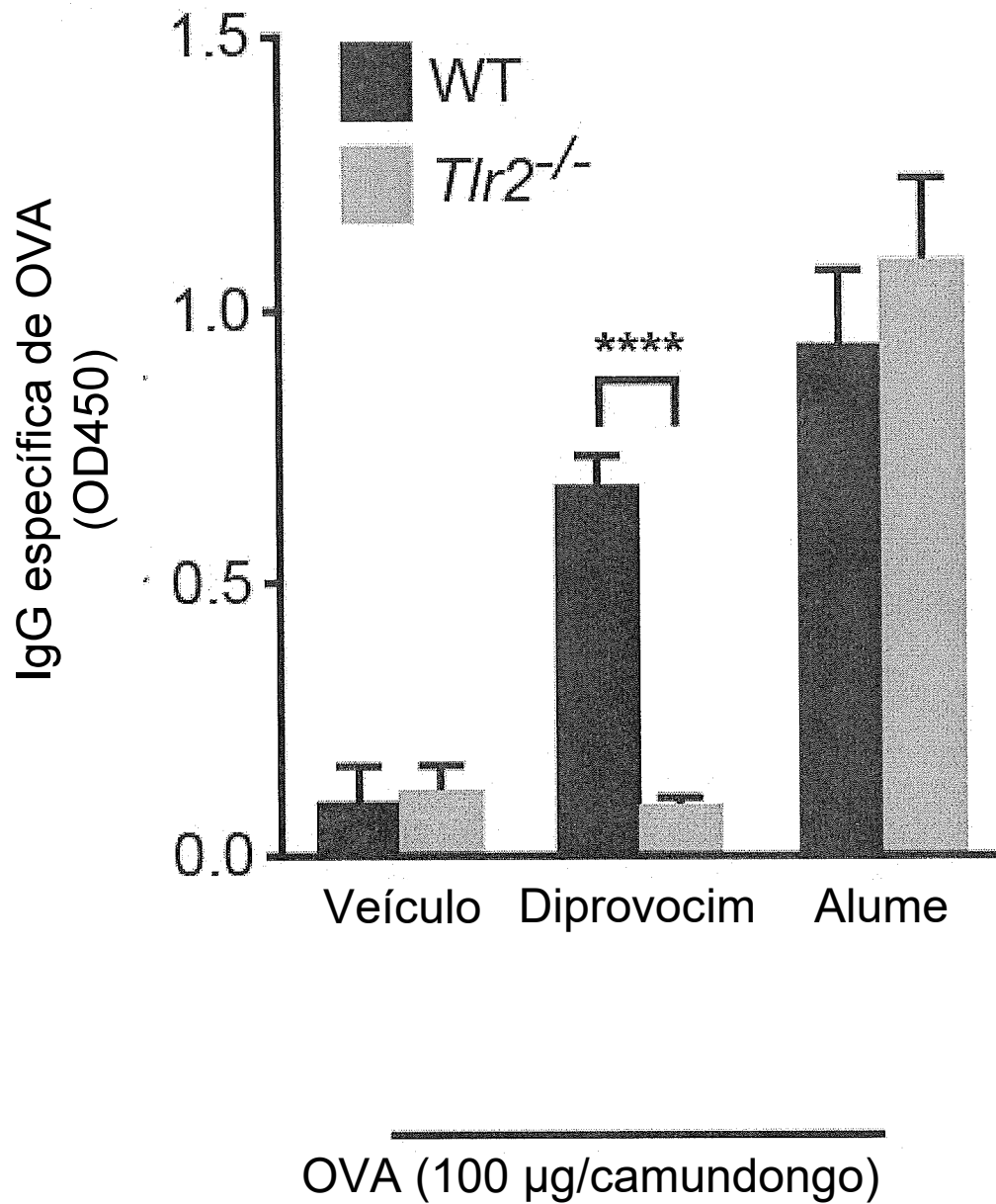


FIGURA 3C

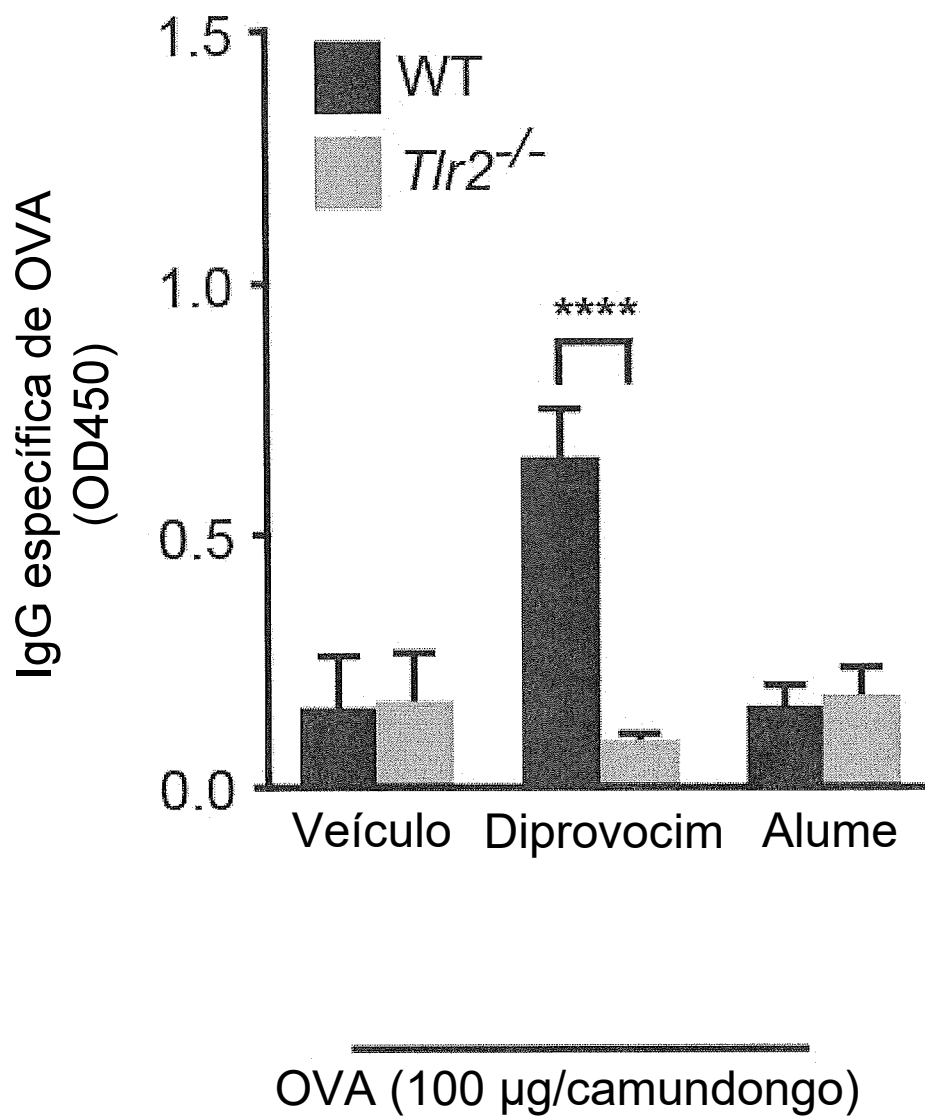


FIGURA 3D

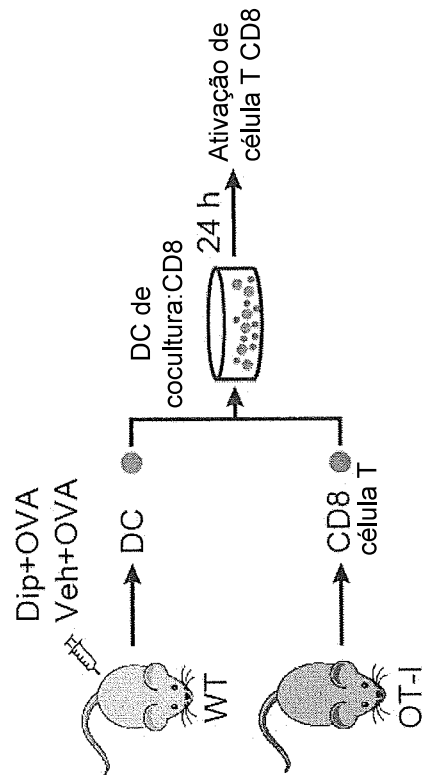
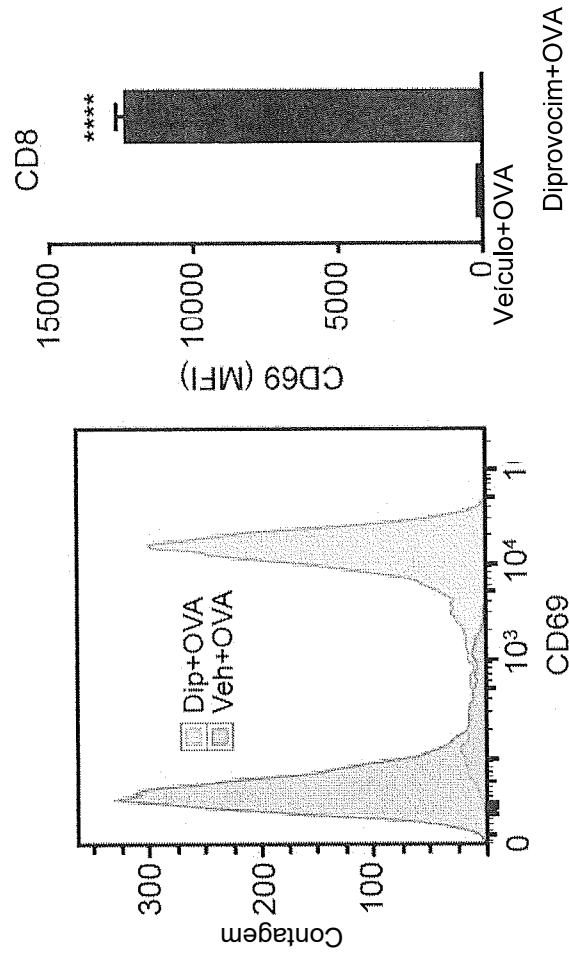


FIGURA 3E

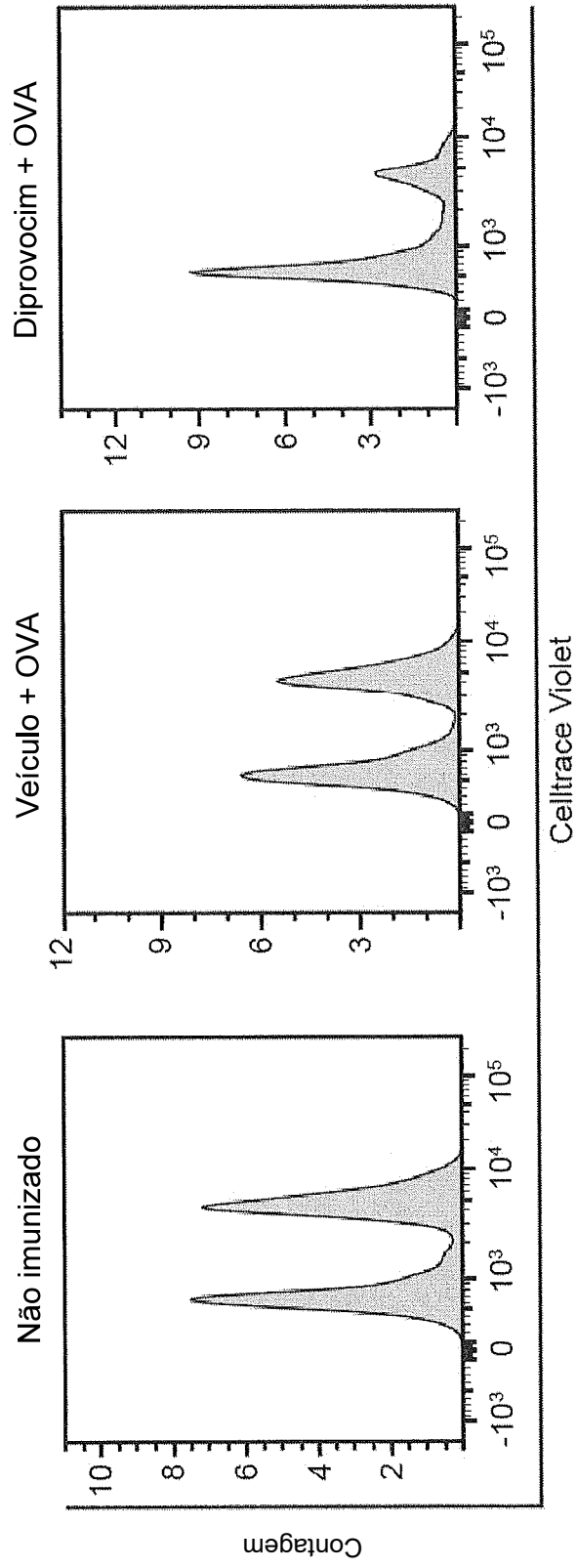
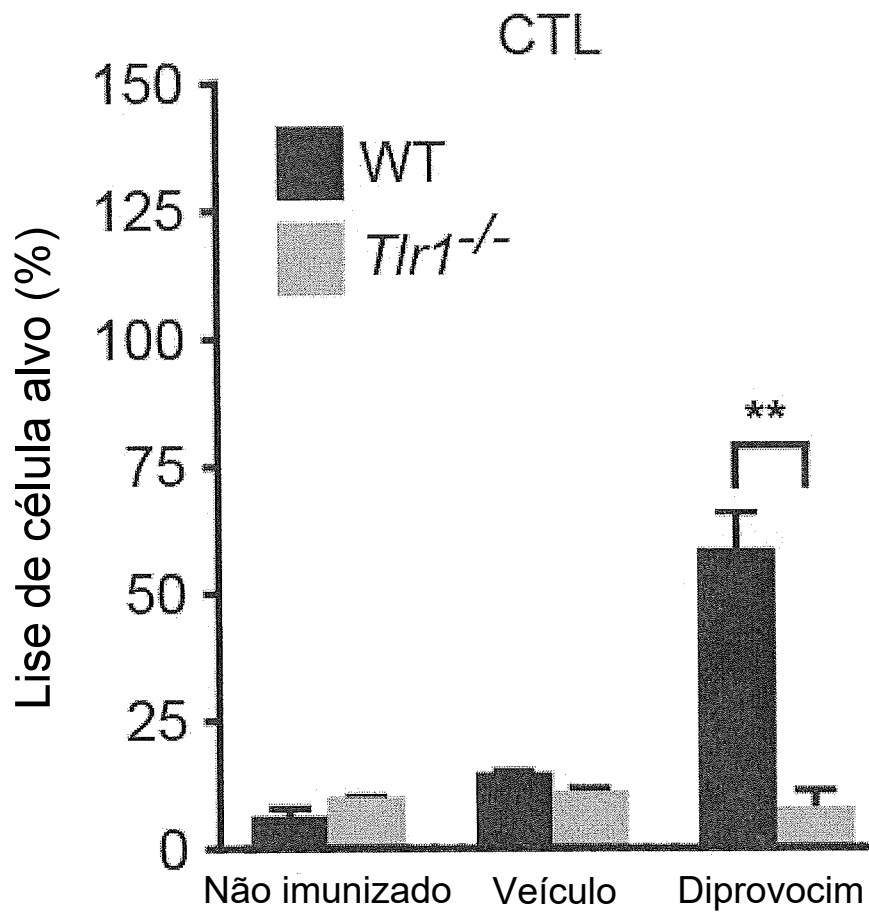
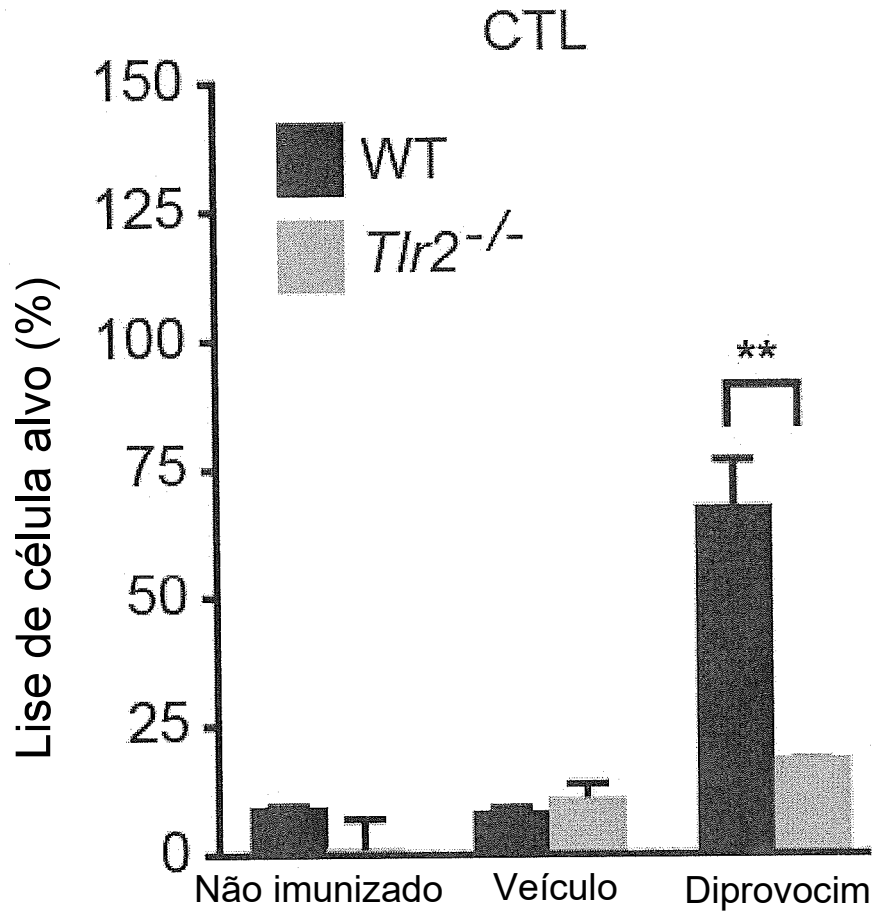


FIGURA 3F



OVA (100 µg/camundongo)

FIGURA 3G



OVA (100 µg/camundongo)

FIGURA 4A

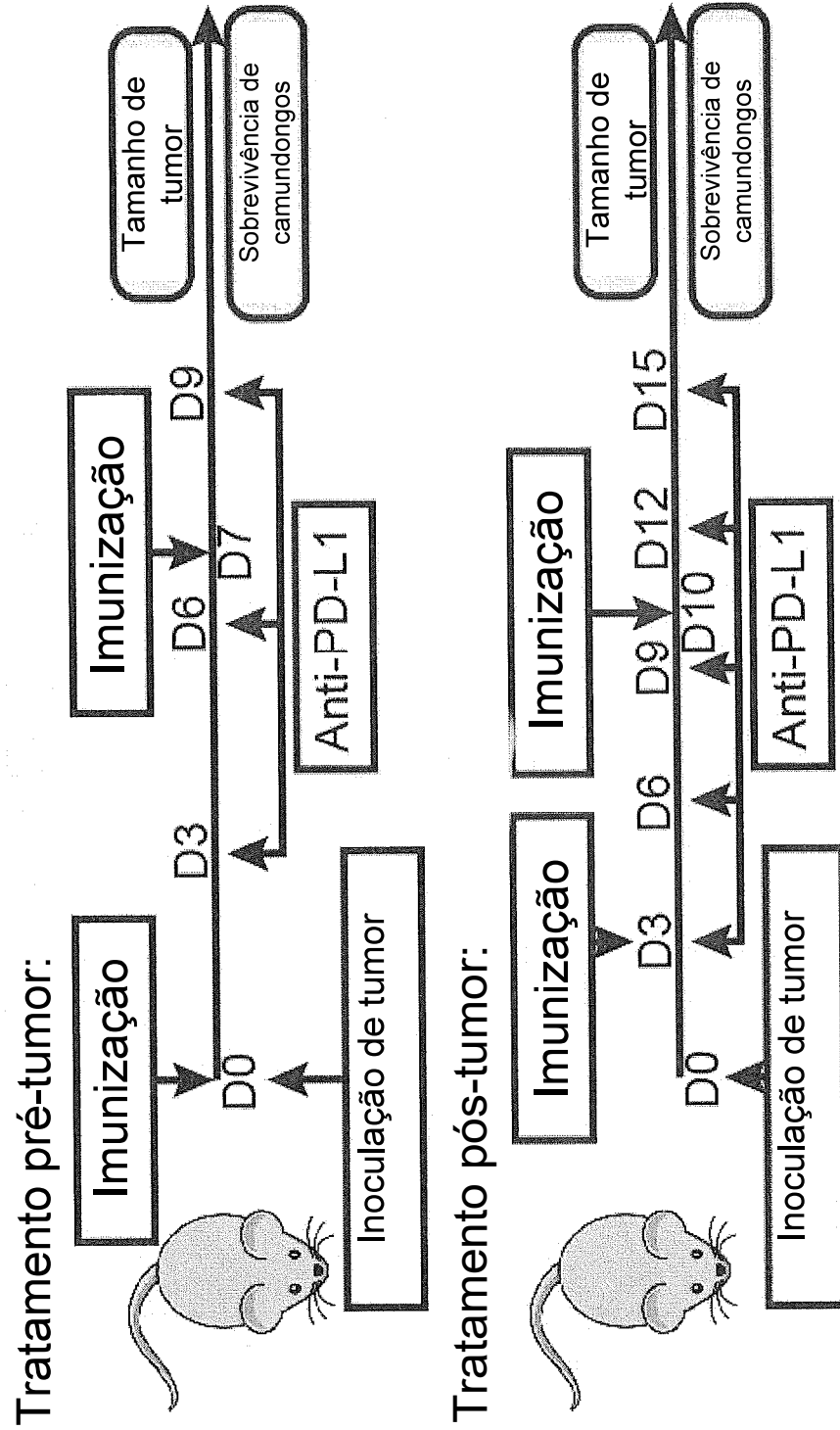


FIGURA 4B

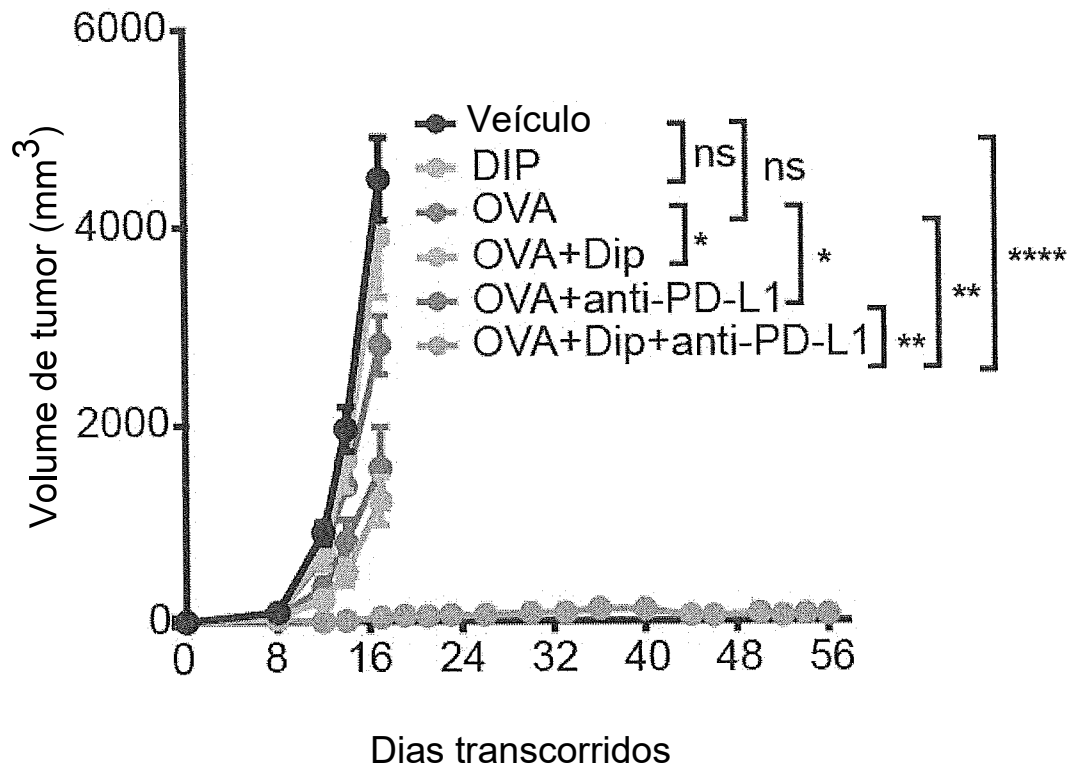


FIGURA 4C

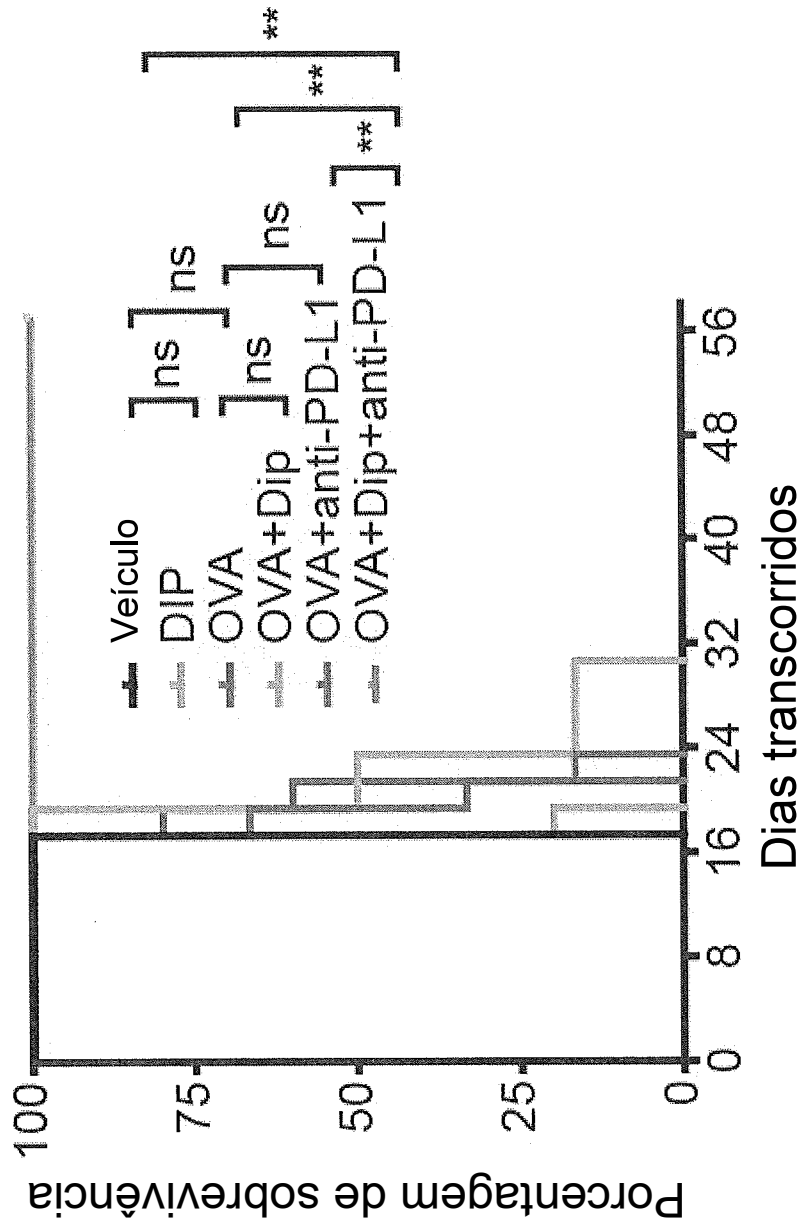


FIGURA 4D

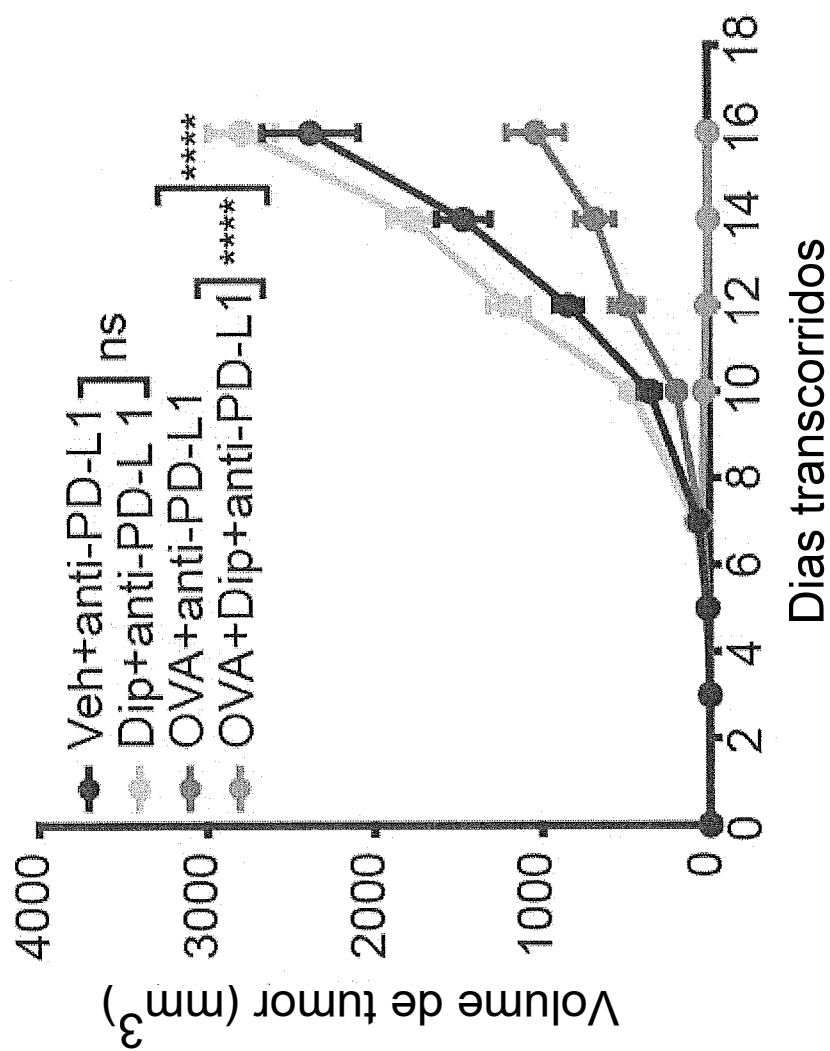


FIGURA 4E

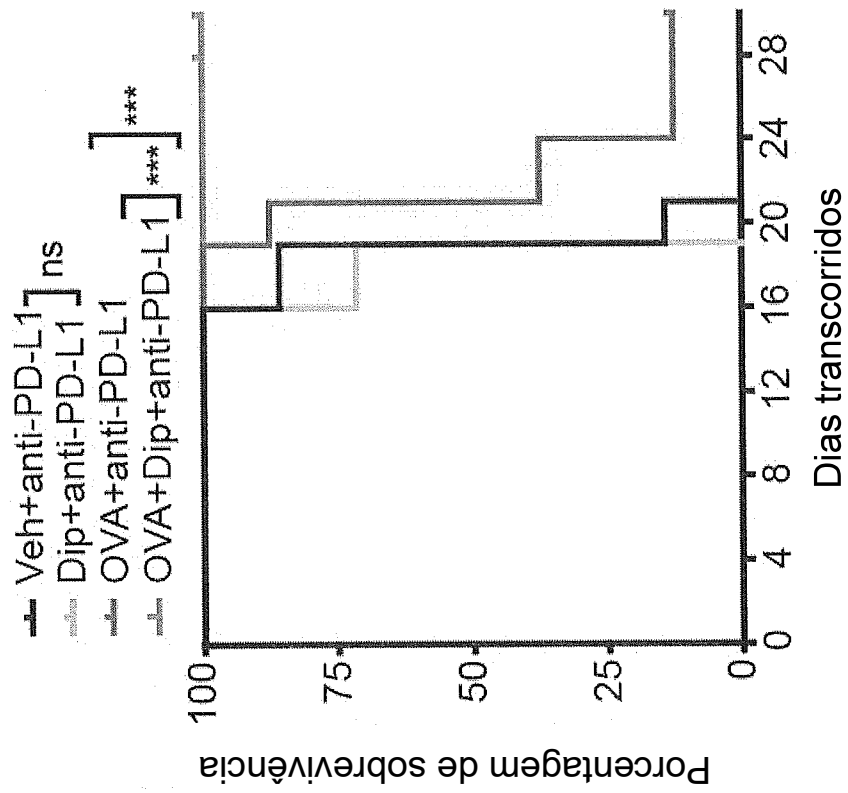


FIGURA 4F

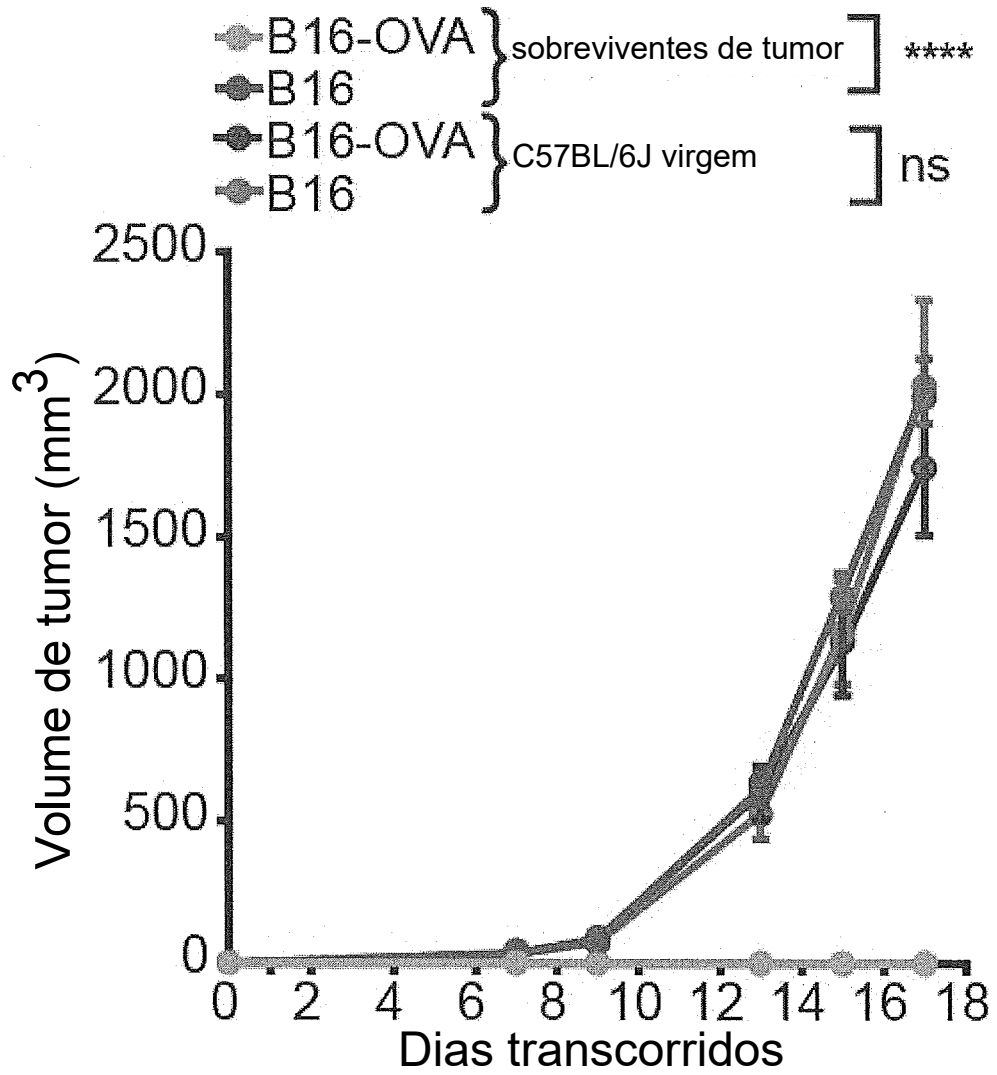


FIGURA 4G

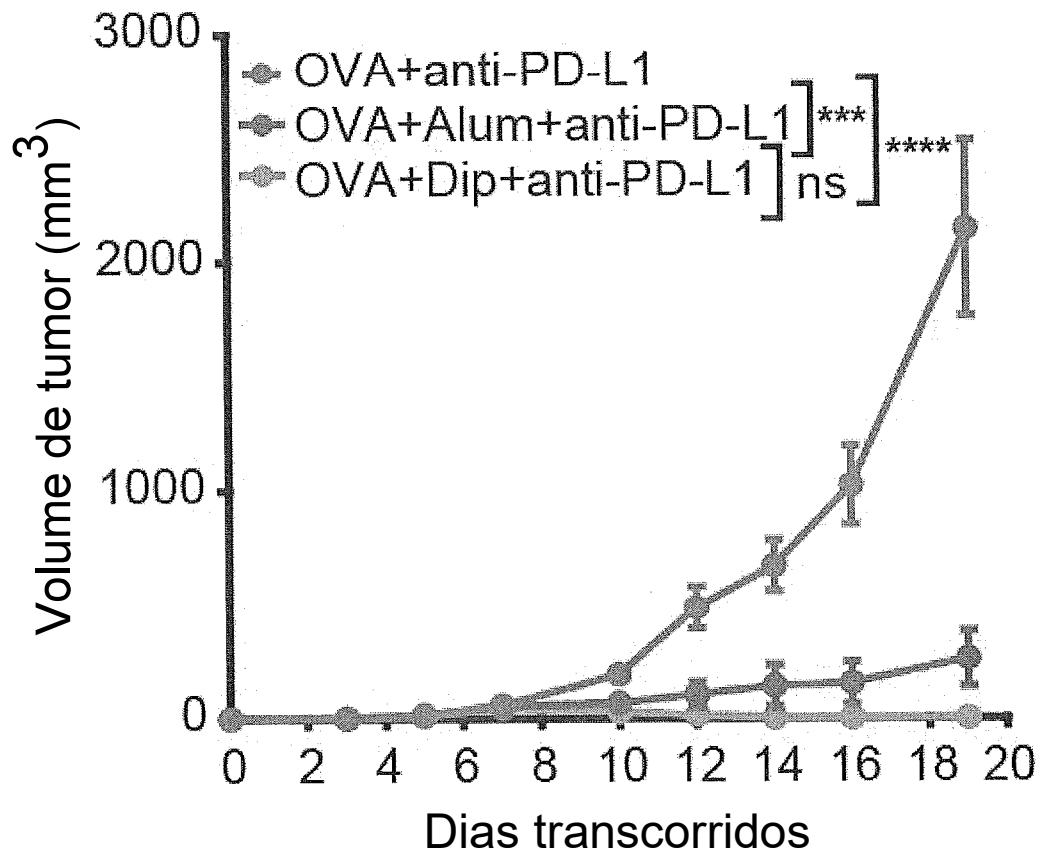


FIGURA 4H

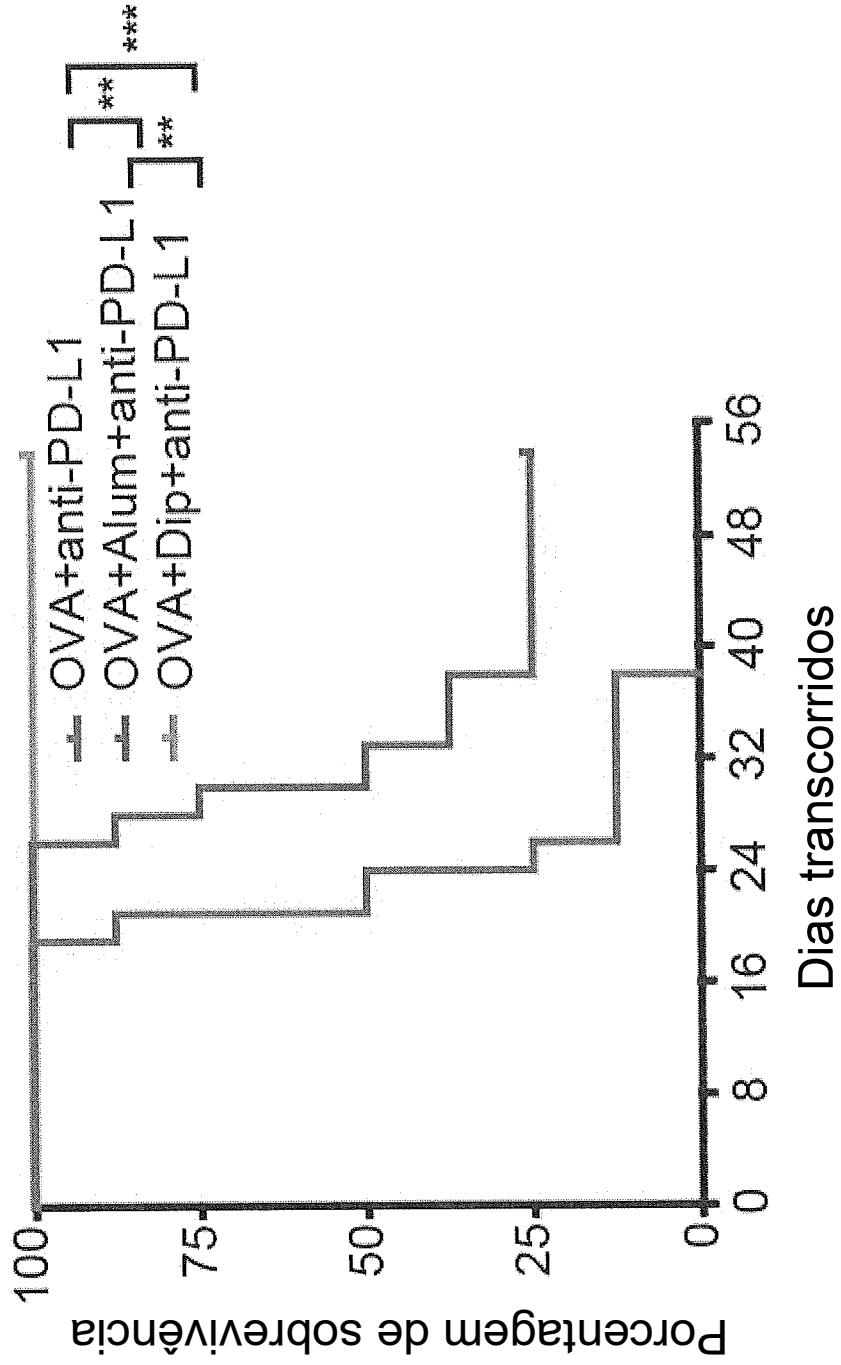


FIGURA 4I

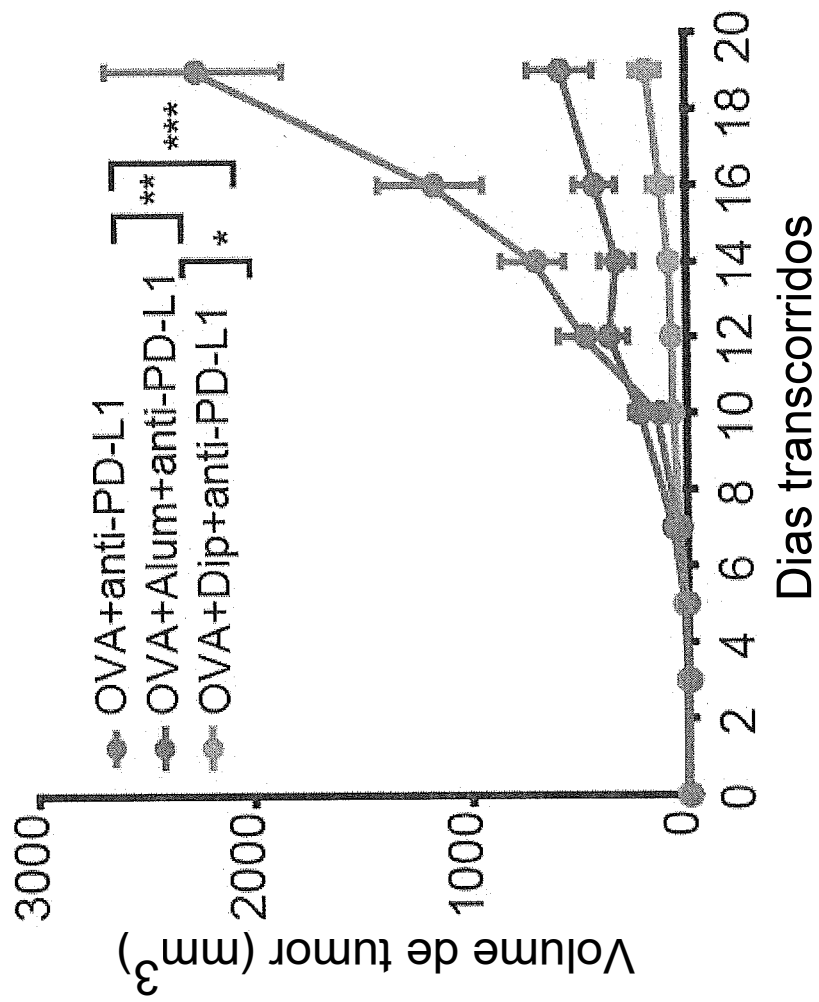


FIGURA 4J

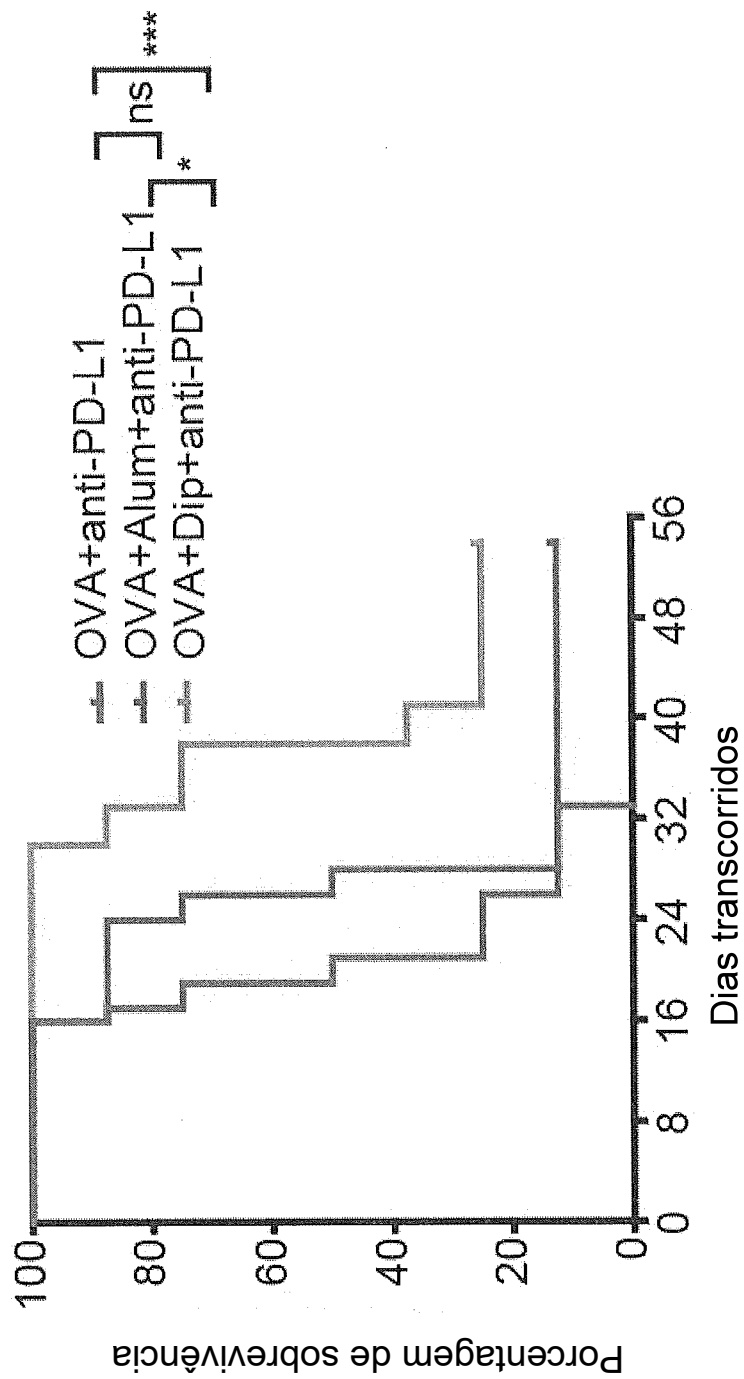


FIGURA 5A

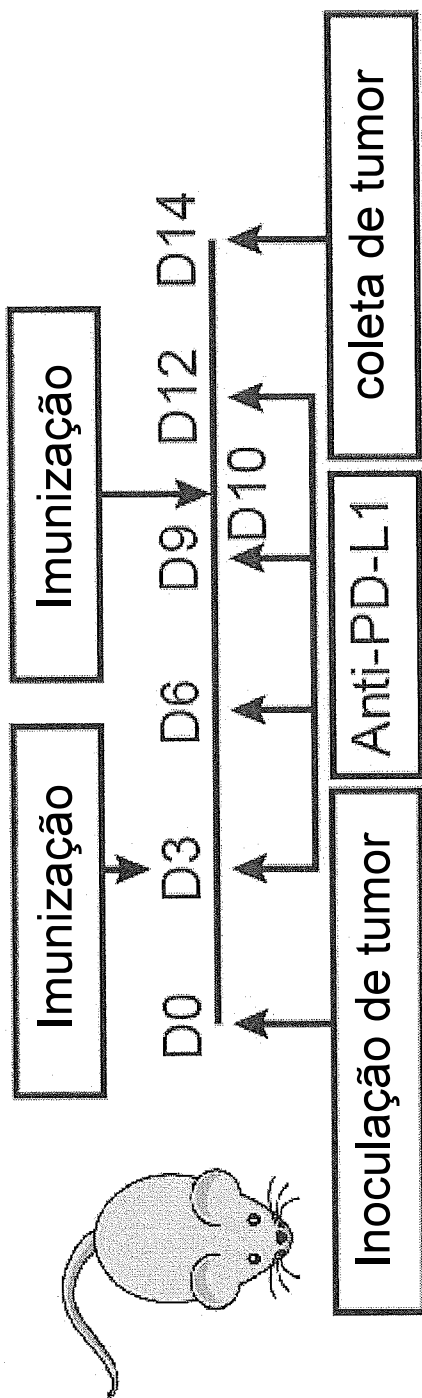


FIGURA 5B

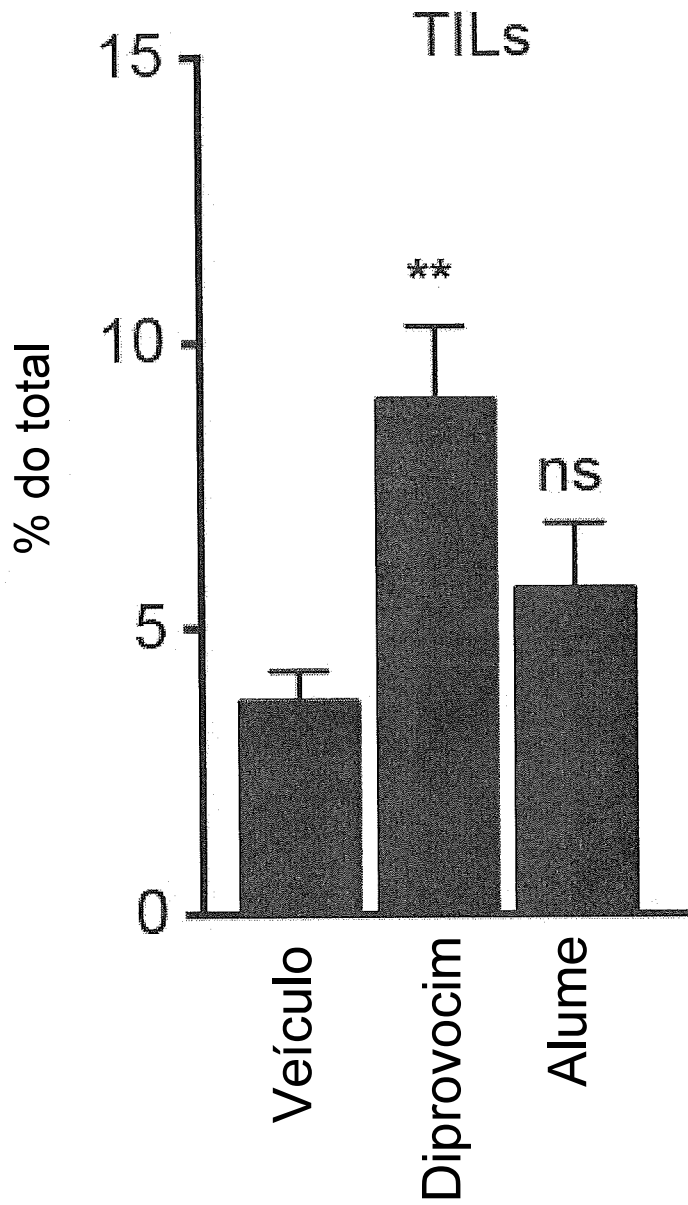


FIGURA 5C

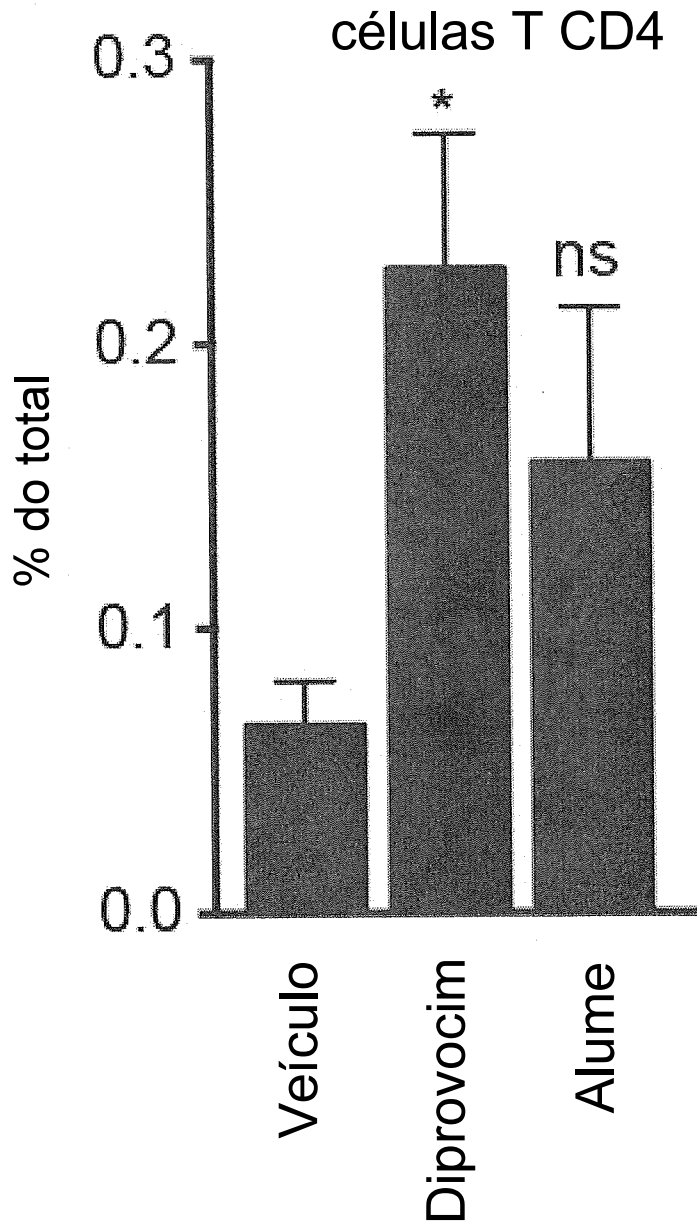


FIGURA 5D

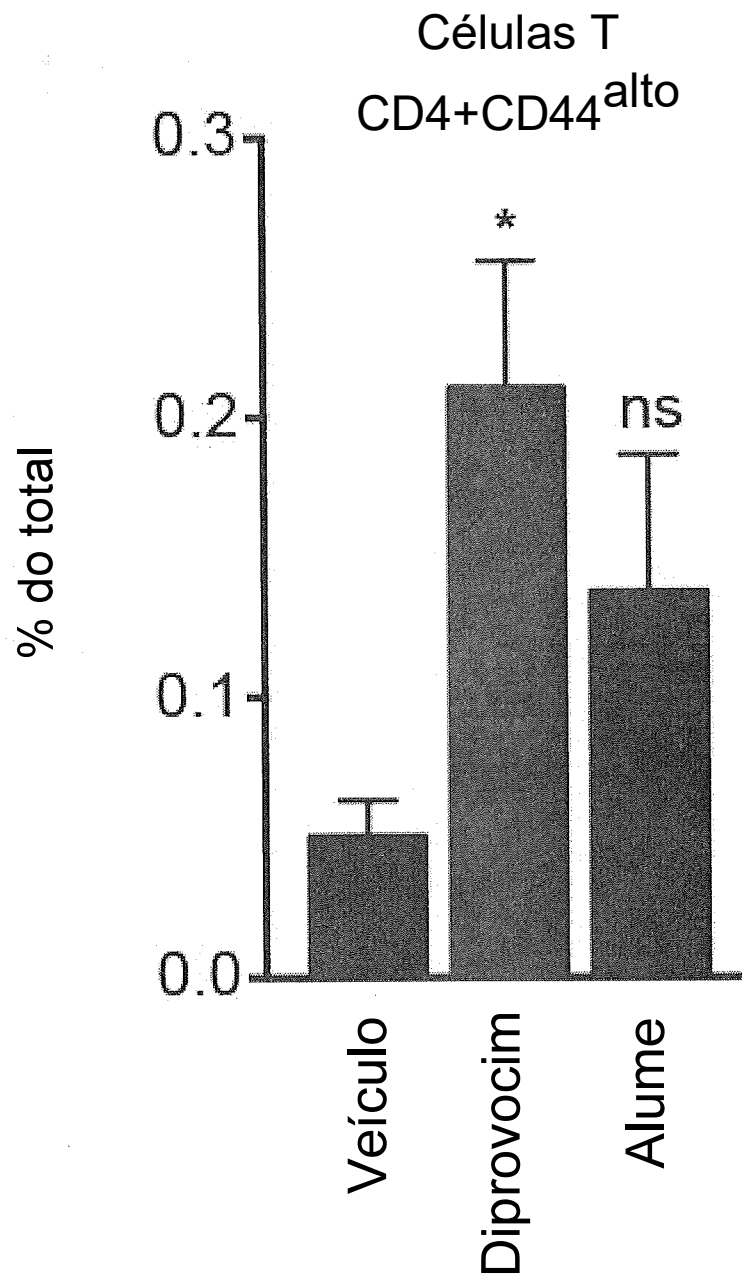


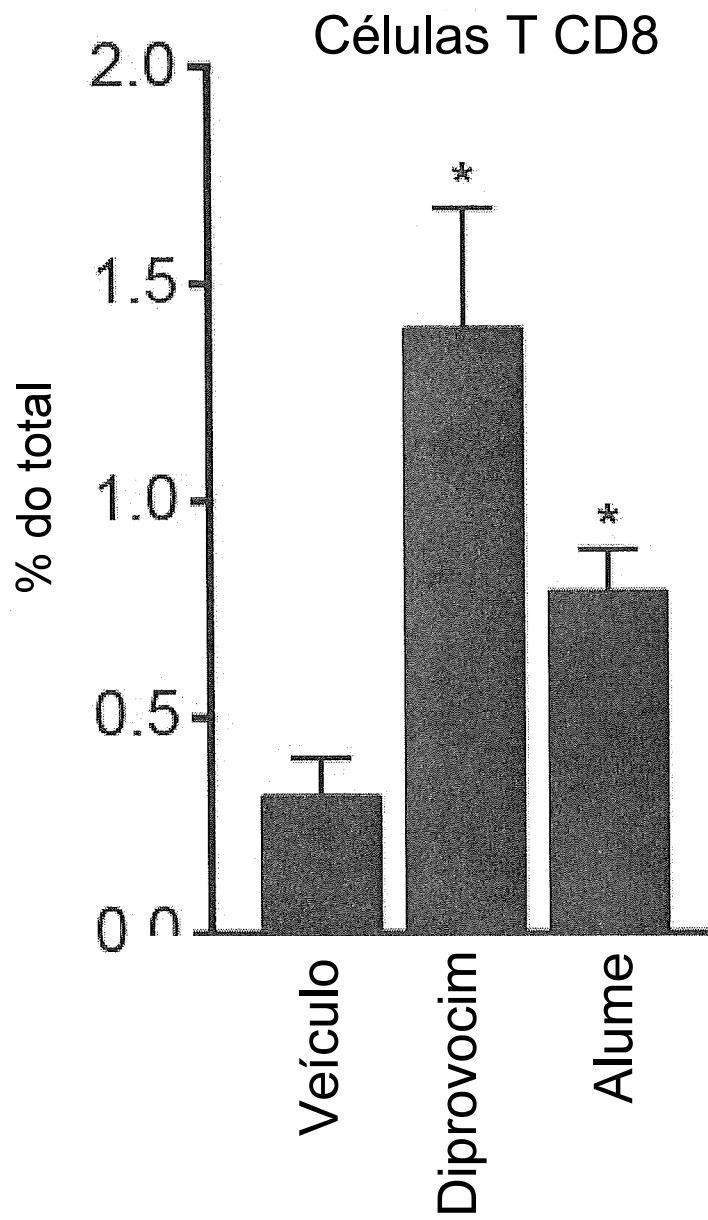
FIGURA 5E

FIGURA 5F

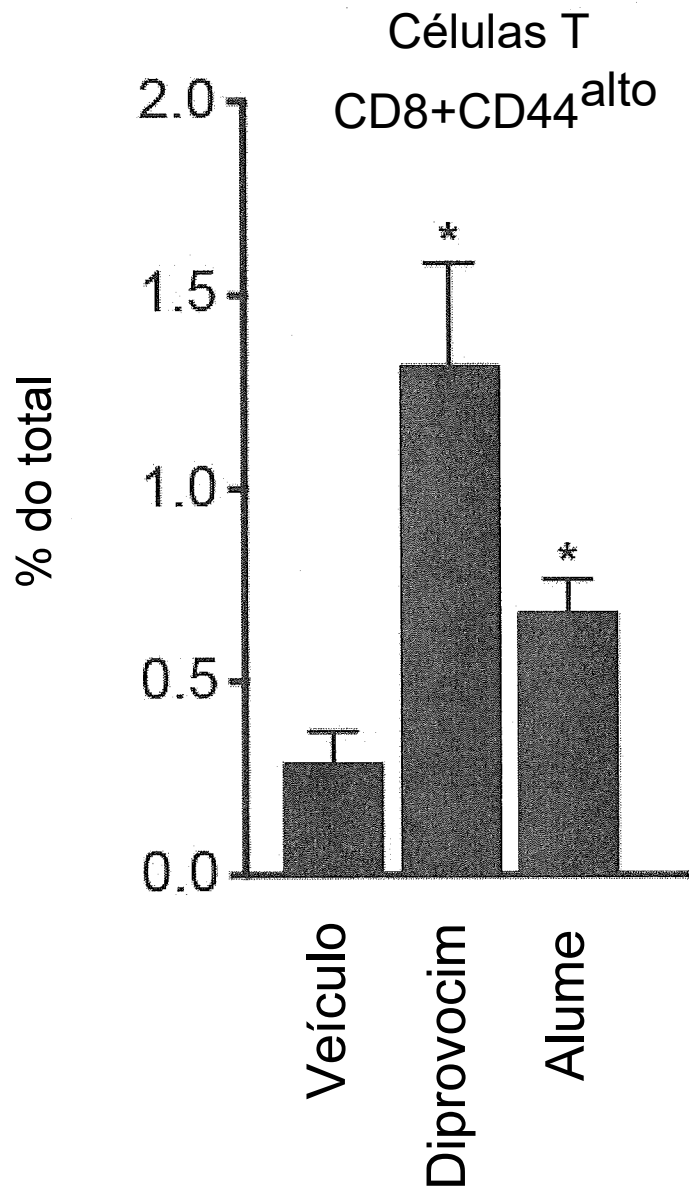


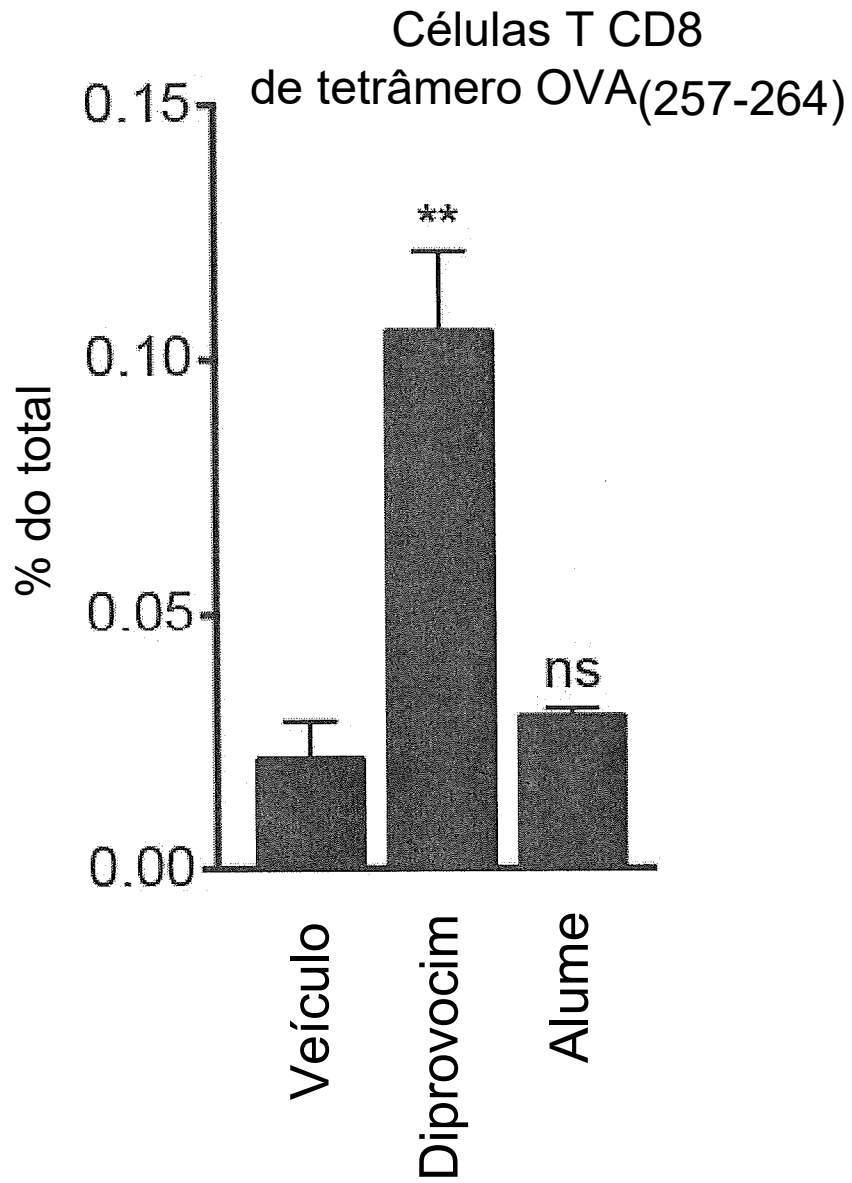
FIGURA 5G

FIGURA 5H

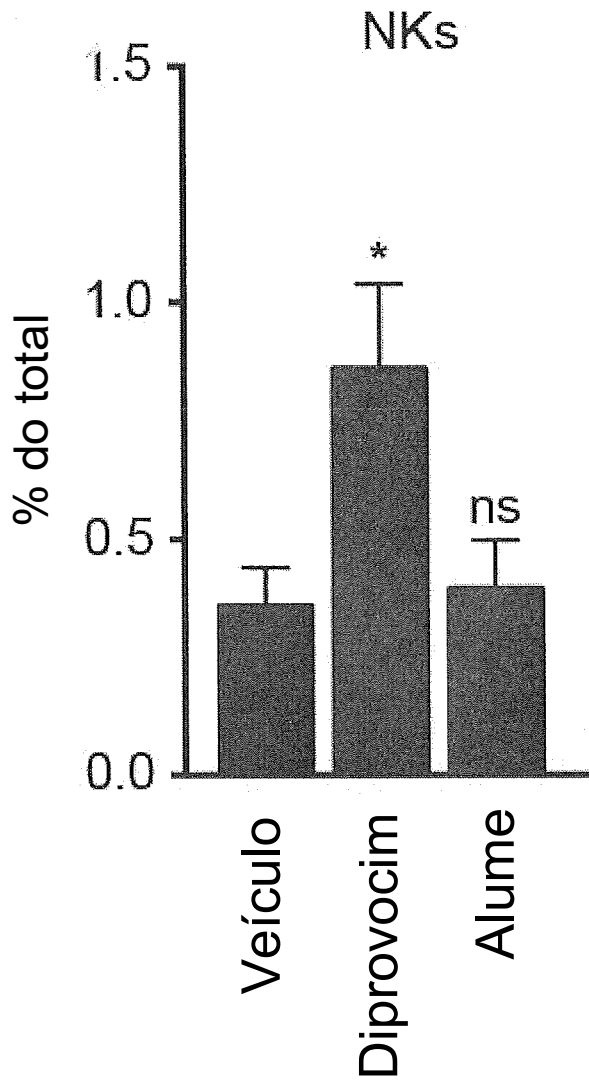


FIGURA 5I

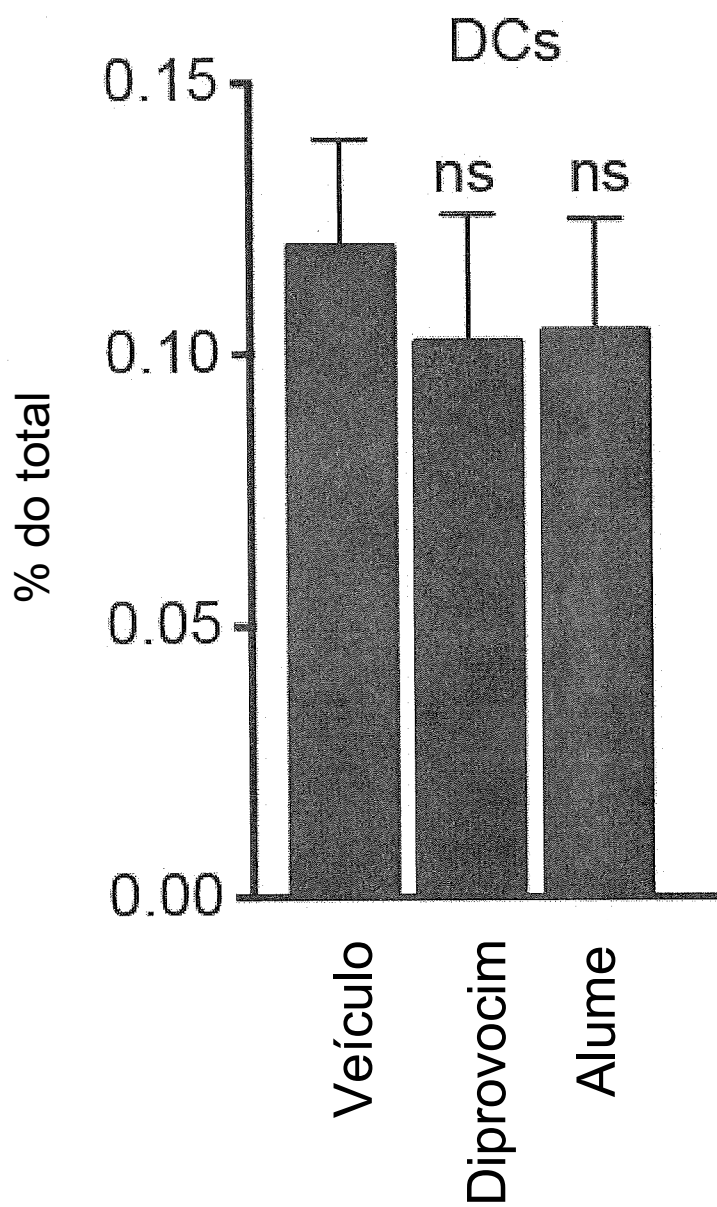


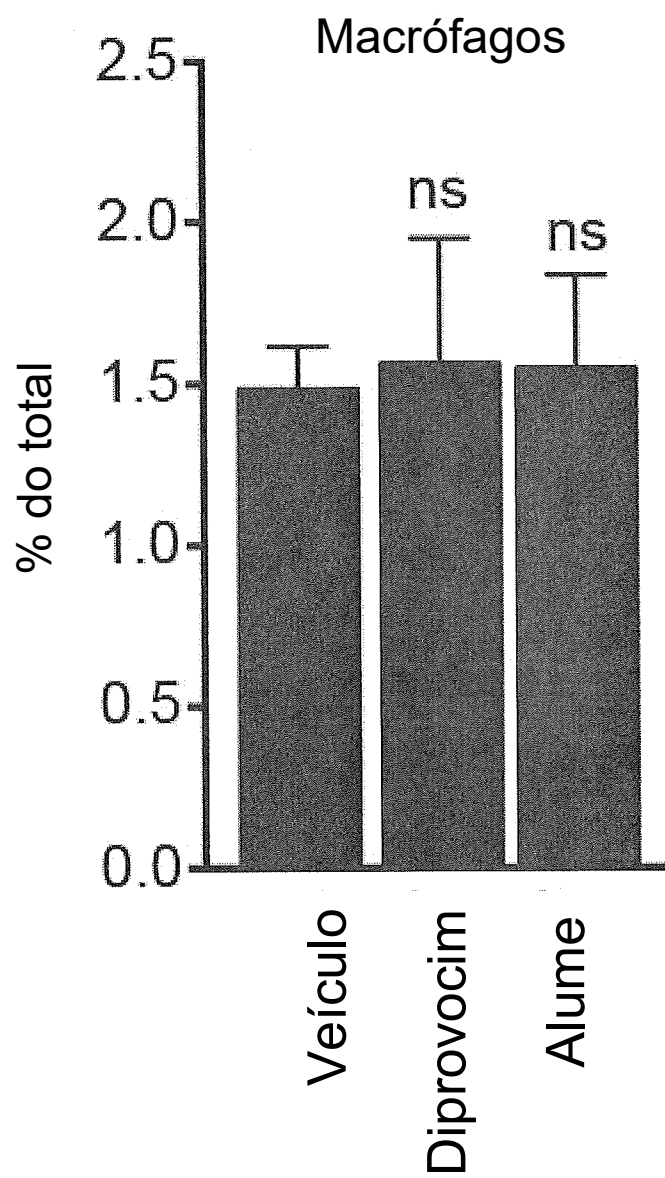
FIGURA 5J

FIGURA 5K

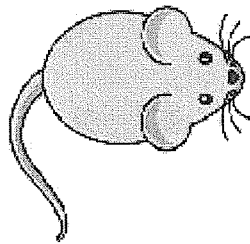
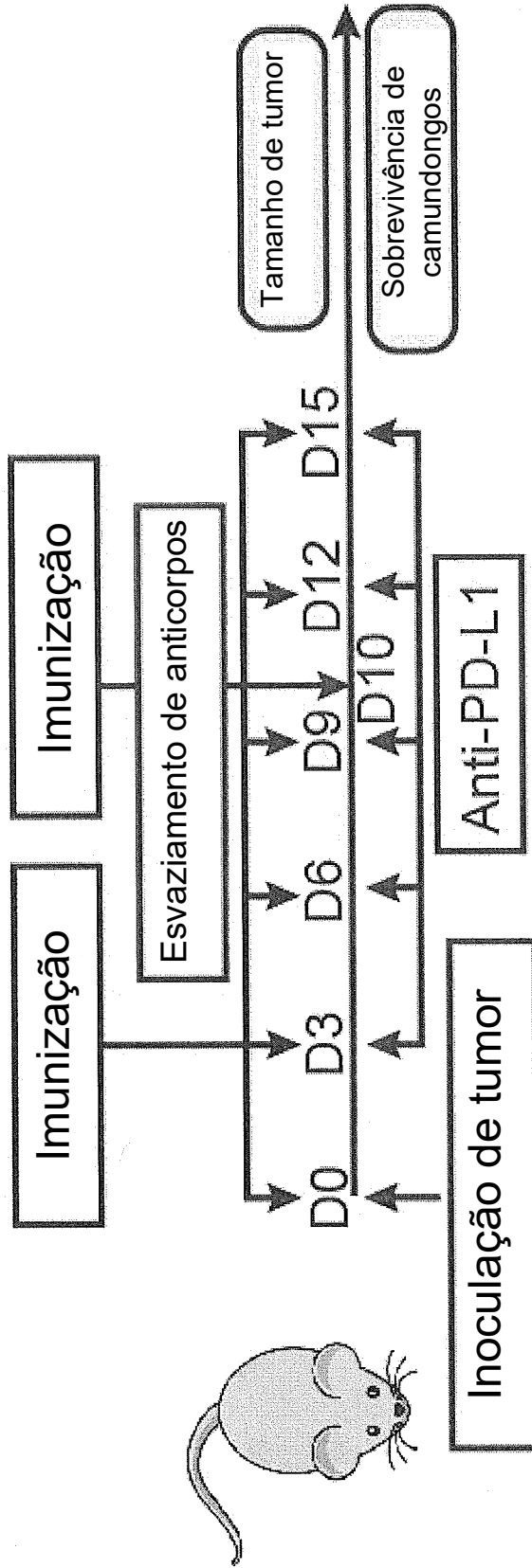
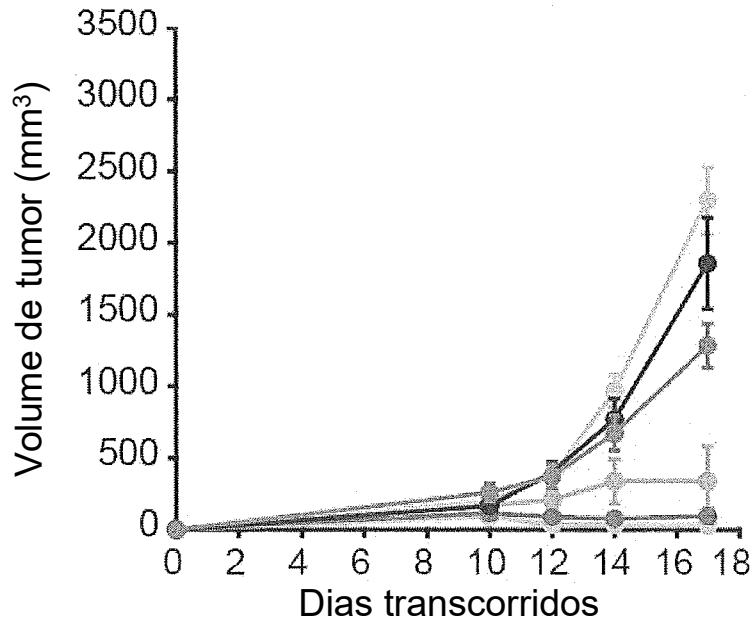


FIGURA 5L



- OVA+Veh+anti-PD-L1
 - OVA+Dip+anti-PD-L1
 - OVA+Dip+anti-PD-L1+anti-CD4
 - OVA+Dip+anti-PD-L1+anti-CD8
 - OVA+Dip+anti-PD-L1+anti-NK1.1
 - OVA+Dip+anti-PD-L1+anti-CD4,CD8, NK1.1
-]****
]ns
]****
]ns
]****
]ns
]**
]ns
]**

FIGURA 5M

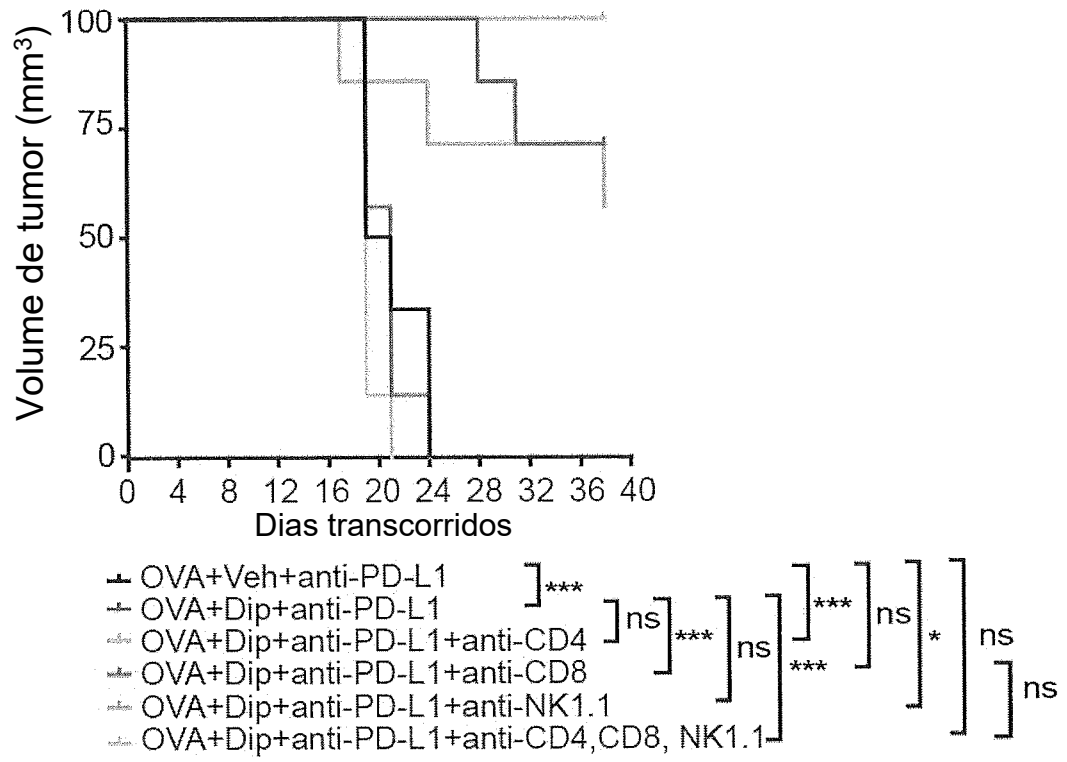


FIGURA 6

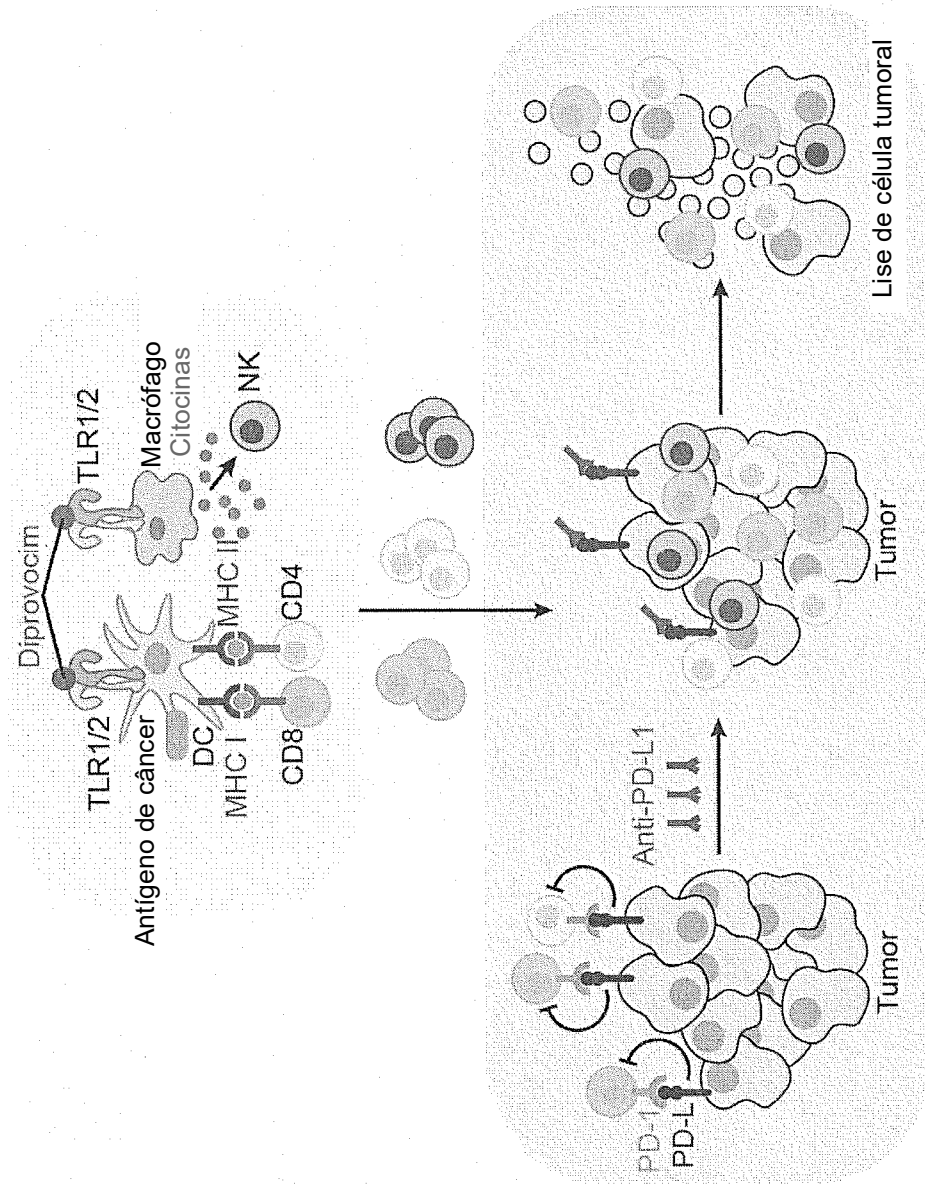


FIGURA 7

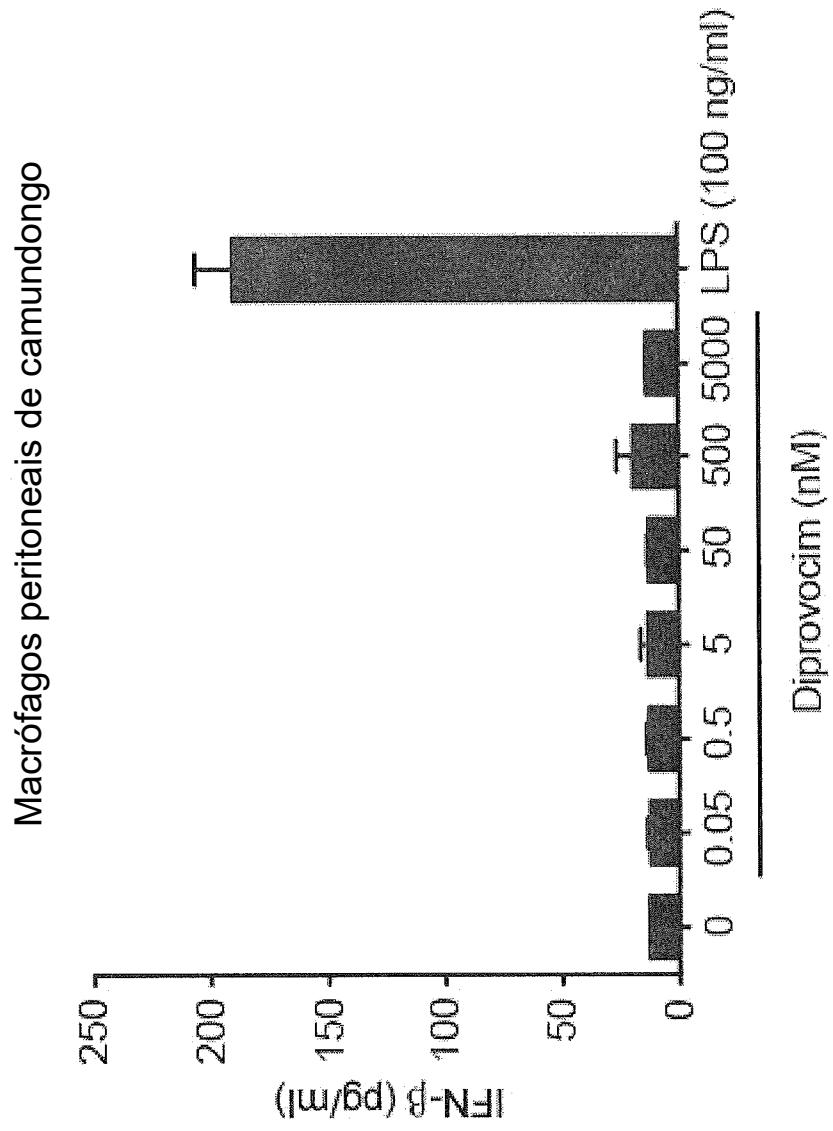


FIGURA 8A

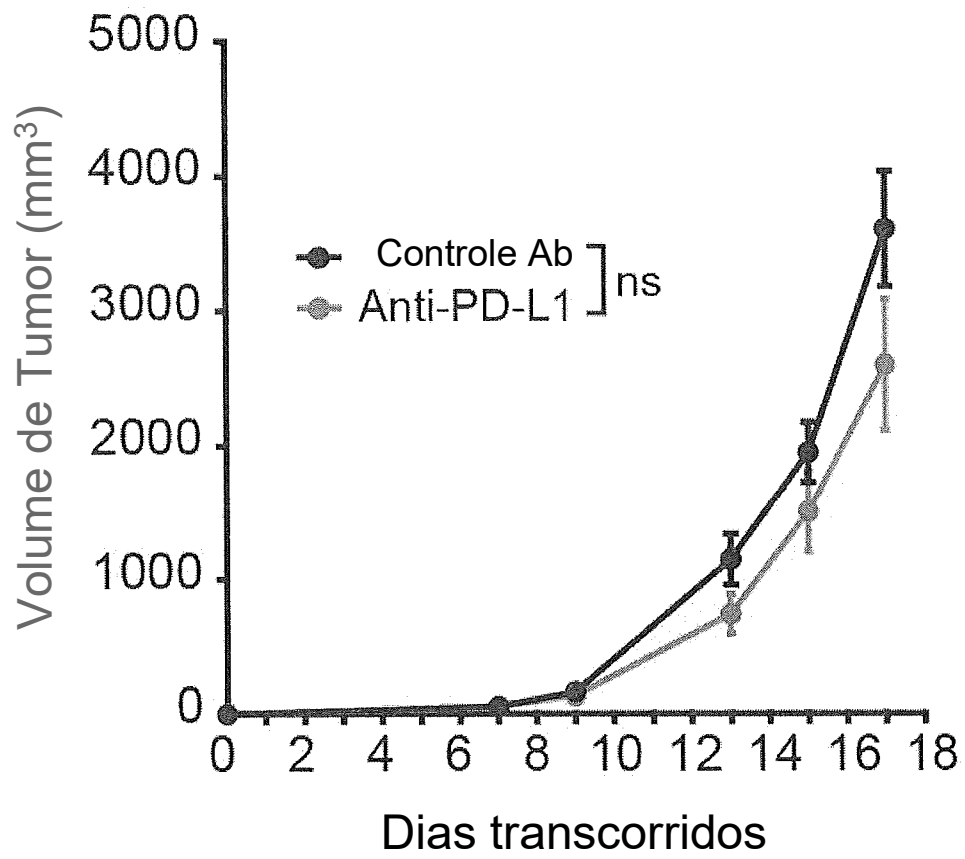


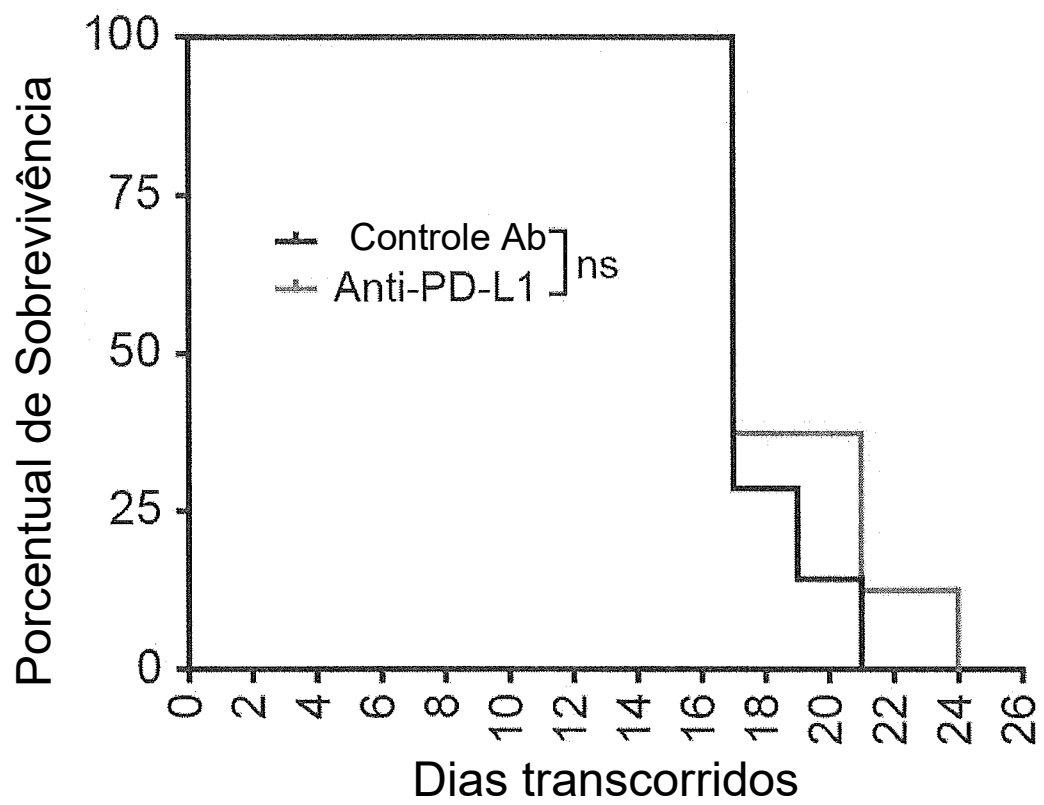
FIGURA 8B

FIGURA 9A

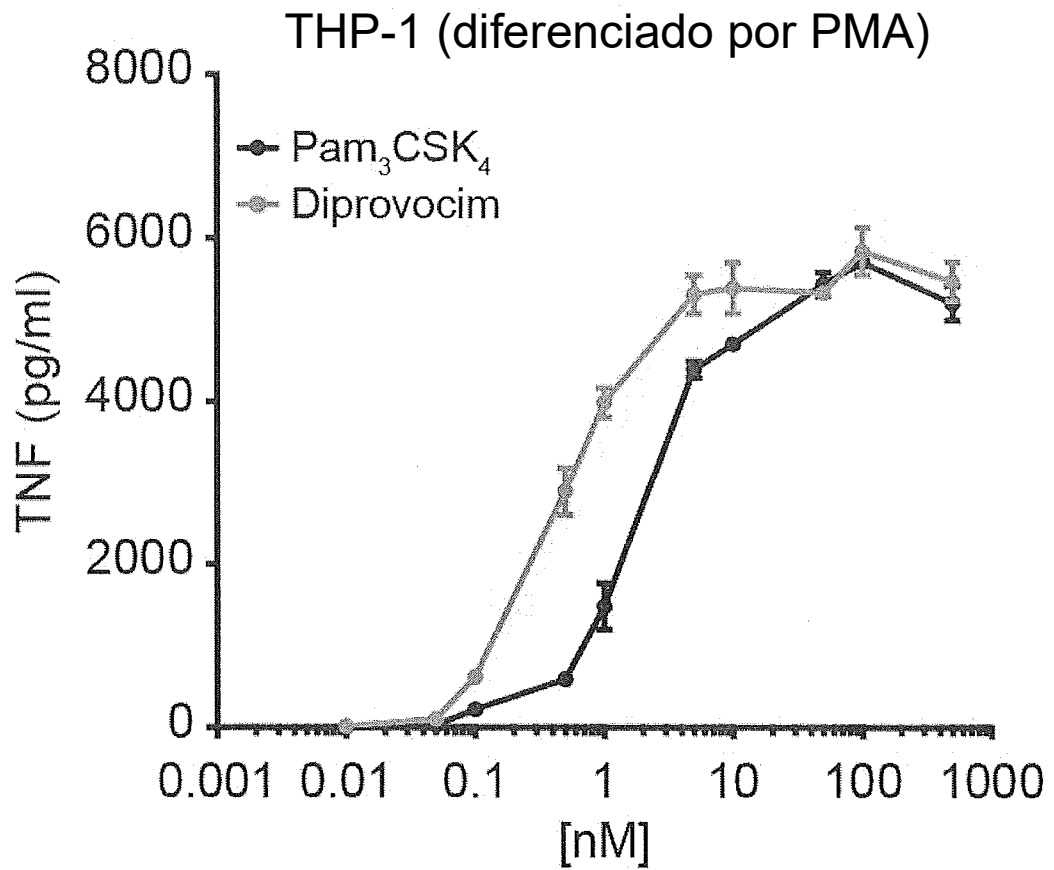
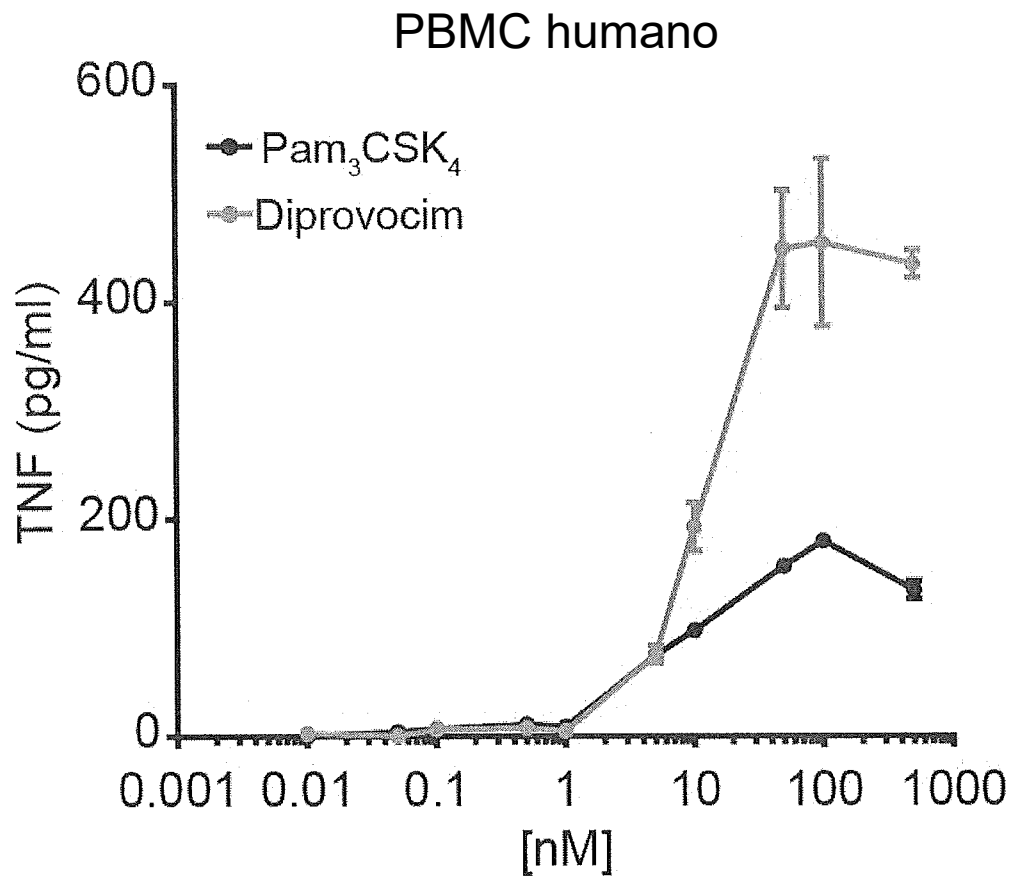


FIGURA 9B



RESUMO

“EFEITO ADJUVANTE DO DIPROVOCIM AGONISTA DE TLR1/2 SINERGIZA COM ANTICORPOS INIBIDORES DE PONTO DE CONTROLE PARA ELIMINAR DOENÇA”

Trata-se de um potente agonista do receptor do tipo Toll (TLR)1/TLR2 de camundongo e de ser humano que foi identificado e otimizado, o Diprovocim, que apresentou um EC₅₀ de 110 pM nas células THP-1 humanas e 1,3 nM nos macrófagos primários peritoneais de camundongo. Nos camundongos, a imunização de ovalbumina adjuvada com Diprovocim promoveu respostas de CTL e humorais específicos do antígeno, e sinergizadas com tratamento com anti-PD-L1 para inibir o desenvolvimento do tumor, que gera memória antitumor de longa duração, que cura ou que prolonga a sobrevivência dos camundongos enxertados com o melanoma de murino B16-OVA. O Diprovocim induziu maiores frequências de leucócitos infiltrantes tumorais do que de alume, dos quais as células T CD8 foram necessárias para o efeito antitumor da imunização mais o tratamento com anti-PD-L1.