



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

(21) BR 112020024551-8 A2



(22) Data do Depósito: 31/05/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 02/03/2021

(54) Título: MÉTODOS PARA USAR MODULADORES DE SPLICING

(51) Int. Cl.: A61K 31/496; A61P 35/00; A61P 35/02; A61P 43/00; A61K 47/64; (...).

(30) Prioridade Unionista: 01/06/2018 US 62/679.696; 01/06/2018 US 62/679.699.

(71) Depositante(es): EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD..

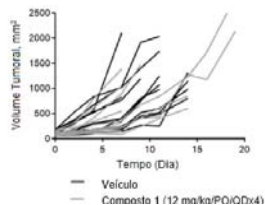
(72) Inventor(es): ERMIRA PAZOLLI; SILVIA BUONAMICI; JAMES PALACINO; MICHAEL SEILER; PING ZHU; EVAN BARRY; LIHUA YU.

(86) Pedido PCT: PCT US2019034992 de 31/05/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/232433 de 05/12/2019

(85) Data da Fase Nacional: 01/12/2020

(57) Resumo: Esta revelação refere-se a métodos para o tratamento de distúrbios neoplásicos administrando-se o Composto 1, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, sozinho e/ou como parte de um conjugado ou composição, e induzindo-se a produção de pelo menos um neoantígeno.



“MÉTODOS PARA USAR MODULADORES DE SPLICING”

[0001] A presente revelação reivindica o benefício de prioridade de Pedido de Patente Provisório nº U.S. 62/679.696, depositado em 1 de junho de 2018; e Pedido de Patente Provisório nº U.S. 62/679.699, depositado em 1 de junho de 2018. Todos os pedidos anteriormente mencionados estão incorporados no presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0002] A presente revelação se refere aos métodos de tratamento ou diagnóstico de cânceres que são amenizáveis em tratamento através da interrupção de splicing de RNA administrando-se o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. A presente revelação se refere, adicionalmente, aos métodos de tratamento ou diagnóstico em que um neoantígeno é induzido mediante administração de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

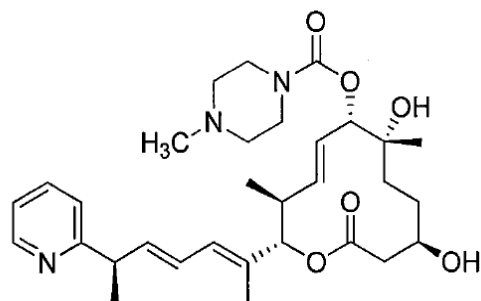
[0003] A maior parte dos genes de codificação de proteínas no genoma humano é composta por vários éxons (regiões codificantes) que são separados por íntrons (regiões não codificantes). A expressão do gene resulta em um único RNA mensageiro precursor (pré-mRNA). As sequências de íntrons são subsequentemente removidas do pré-mRNA por um processo chamado splicing, que resulta no RNA mensageiro maduro (mRNA). Com a inclusão de diferentes combinações de éxons, o splicing alternativo dá origem a mRNAs que codificam isoformas de proteínas distintas.

[0004] O splicing do RNA é catalisado pelo spliceossoma, um complexo multiproteína-RNA dinâmico composto por cinco pequenos RNAs nucleares (snRNAs U1, U2, U4, U5 e U6) e proteínas associadas. O spliceossoma se agrupa em pré-mRNAs para estabelecer uma cascata dinâmica de múltiplas interações de RNA e proteínas que catalisam a excisão dos íntrons e a ligação dos éxons (Matera e Wang (2014) Nat Rev Mol Cell Biol. 15(2):108 a 121). O acúmulo de evidências associou as doenças humanas à desregulação no splicing de RNA que afetam muitos genes (Scotti e Swanson (2016) Nat Rev Genet. 17(1):19 a 32).

[0005] O spliceossoma é um alvo importante na biologia do câncer. Vários estudos já documentaram alterações significativas no perfil de splicing das células cancerosas, bem como nos próprios fatores de splicing (Agrawal et al. (2018) *Curr Opin Genet Dev.* 48:67 a 74). O splicing alternativo pode levar à inclusão/exclusão de éxon diferencial, retenção de íntron ou uso de sítios de splicing críptico (Seiler et al. (2018) *Cell Rep.* 23(1):282 a 296). Em conjunto, esses eventos são responsáveis por alterações funcionais que podem contribuir para a tumorigênese ou resistência à terapia (Siegfried e Karni (2018) *Curr Opin Genet Dev.* 48:16 a 21).

[0006] Certos produtos naturais e derivados do mesmo podem ligar o complexo de spliceossoma SF3b. (Produtos naturais e derivados exemplificativos dos mesmos, tais como certos compostos de pladienolida B e compostos relacionados, são revelados nos documentos nº WO 2002/060890; WO 2004/011459; WO 2004/011661; WO 2004/050890; WO 2005/052152; WO 2006/009276; e WO 2008/126918.) Essas pequenas moléculas modulam o splicing, promovendo-se a retenção de íntron e/ou salto de éxon (Teng et al. (2017) *Nat Commun.* 8:15.522). Uma porção significativa dos transcritos resultantes contém códons de parada prematuros que ativam a degradação de mRNA mediada por mutação sem sentido (NMD). Além disso, visto que o splicing canonical é prejudicado, os transcritos canonicais são consideravelmente reduzidos, o que pode afetar negativamente a função e a viabilidade celular. Por esta razão, os moduladores de splicing tornaram-se uma classe promissora de fármacos para o tratamento de câncer (Puthenveetil et al. (2016) *Bioconjugate Chem.* 27:1.880 a 1.888).

[0007] Mostrou-se anteriormente que compostos de pladienolida piridina que têm a Fórmula I, denominados no presente documento "Composto 1" e sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo:



(I)

também conhecido como, 4-metilpiperazina-1-carboxilato de (2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-di-hidroxi-3,7-dimetil-12-oxo-2-((R,2E,4E)-6-(piridin-2-il)hepta-2,4-dien-2-il)oxaciclododec-4-en-6-ila, demonstram atividade de modulador de splicing e letalidade celular em linhagens celulares mutantes SF3b1. Consultar, por exemplo, o Documento de Patente nº U.S. 9.481.669 B2 e o Pedido Internacional nº PCT/US2016/062525, em que todos estão incorporados a título de referência.

[0008] O bloqueio do ponto de verificação imunológico (ICB) demonstrou recentemente ser uma mudança de paradigma para o tratamento de vários tipos diferentes de câncer. Entretanto, nem todos os pacientes demonstram respostas robustas/duráveis ao ICB. Consultar, por exemplo, Zappasodi, R. *et al.* Emerging Concepts for Immune Checkpoint Blockade-Based Combination Therapies. *Cancer Cell* **33**, 581 a 598, doi:10.1016/j.ccell.2018.03.005 (2018); e Wolchok, J. D. *et al.* Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* **377**, 1,345 a 1,356, doi:10.1056/NEJMoa1709684 (2017). Portanto, há uma necessidade de constatar agentes terapêuticos complementares para administração em combinação com ICB ou qualquer outra terapia para aprimorar e/ou maximizar a resposta do paciente.

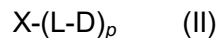
[0009] Em várias modalidades, a presente revelação fornece, em parte, compostos de pladienolida piridina com atividade biológica contra células

neoplásicas. Os compostos podem retardar, inibir e/ou reverter o crescimento de tumor em mamíferos e podem ser úteis para o tratamento de pacientes humanos com câncer.

[0010] A presente revelação se refere, mais especificamente, em várias modalidades, ao Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, que tem capacidade para ligar e matar células neoplásicas.

[0011] Em várias modalidades, a presente revelação se refere, adicionalmente, aos conjugados (por exemplo, conjugados de anticorpo-fármaco (ADCs), conjugados de peptídeo-fármaco (PDCs), etc.) que têm capacidade para ligar e entregar um agente citotóxico, por exemplo, um composto revelado no presente documento, por exemplo, para matar células neoplásicas alvejadas. Em várias modalidades, os conjugados revelados no presente documento compreendem um ligante que liga o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, a um agente de ligação de célula (por exemplo, um anticorpo, fragmento de ligação a antígeno, peptídeo, receptor, fragmento de receptor, etc.).

[0012] Em algumas modalidades, os conjugados revelados no presente documento podem ser representados pela Fórmula II:



em que

X é um agente de ligação de célula que alveja uma célula neoplásica ou outro alvo relacionado à oncologia (por exemplo, um antígeno expresso de maneira predominante, exclusiva ou preferencial em uma célula cancerosa);

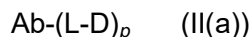
D é um Composto de Fórmula I (por exemplo, Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo);

L é um ligante que liga covalentemente X a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15.

[0013] Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula para uso em um conjugado (por exemplo, um conjugado de anticorpo-fármaco)

compreende ou consiste em um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo. Em algumas modalidades, o conjugado é um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC). Em algumas modalidades, o conjugado é um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC) de Fórmula II(a):



em que

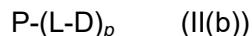
Ab é um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo que alveja uma célula neoplástica;

D é um Composto de Fórmula I (por exemplo, Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo);

L é um ligante que liga covalentemente Ab a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15.

[0014] Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula para uso em um conjugado (por exemplo, um conjugado de peptídeo-fármaco) compreende ou consiste em um peptídeo (por exemplo, um peptídeo linear ou cíclico). Em algumas modalidades, o conjugado é um conjugado de peptídeo-fármaco (PDC). Em algumas modalidades, o conjugado é um conjugado de peptídeo-fármaco (PDC) de Fórmula II(b):



em que

P é um peptídeo que alveja uma célula neoplástica;

D é um Composto de Fórmula I (por exemplo, Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo);

L é um ligante que liga covalentemente P a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15.

[0015] Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula para uso em um conjugado compreende ou consiste em um receptor ou um fragmento de receptor.

[0016] Outros agentes de ligação de célula exemplificativos para uso nos conjugados revelados (por exemplo, conjugados de Fórmula II)

também são fornecidos e descritos no presente documento. Por exemplo, em algumas modalidades, o agente de ligação de célula pode compreender um DARPin, um duocorpo, um peptídeo bicíclico, um nanocorpo, uma centirina, MSH (hormônio estimulante de melanócito), uma molécula de fusão de receptor-Fc, uma estrutura de receptor de célula T, um hormônio esteroide, um fator de crescimento ou um fator estimulante de colônia. Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula pode compreender um arcabouço sem anticorpos (por exemplo, um arcabouço dimensionado por domínio ou um peptídeo restrito).

[0017] Em algumas modalidades, o ligante usado em um conjugado revelado no presente documento é estável fora de uma célula, de modo que o conjugado permaneça intacto quando presente em condições extracelulares, porém, tenha capacidade para ser clivado, por exemplo, com o uso de uma porção química clivável no ligante que conecta o agente de ligação de célula e o agente citotóxico, mediante internalização em uma célula, por exemplo, uma célula neoplástica. Em algumas modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é clivado a partir do agente de ligação de célula (por exemplo, um anticorpo, fragmento de ligação a antígeno, peptídeo, receptor, ou fragmento de receptor) quando o conjugado entra em uma célula que expressa um antígeno alvejado pelo agente de ligação de célula do conjugado. Em algumas modalidades, o ligante é um ligante clivável. Em outras modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é liberado do conjugado através da degradação do agente de ligação de célula e/ou ligante. Em algumas modalidades, o ligante é um ligante não clivável.

[0018] Em algumas modalidades, p é um número inteiro de 1 a 15. Em algumas modalidades, p é um número inteiro de 1 a 10. Em algumas modalidades, p é um número inteiro de 1 a 8. Em algumas modalidades, p é um número inteiro de 1 a 4. Em algumas modalidades, p é um número inteiro de 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3 ou 1 a 2. Em algumas

modalidades, p é um número inteiro de 2 a 10, 2 a 9, 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, 2 a 5, 2 a 4 ou 2 a 3. Em algumas modalidades, p é um número inteiro de 2 a 3. Em algumas modalidades, p é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8.

[0019] Em algumas modalidades, é fornecido no presente documento um método para induzir pelo menos um neoantígeno, que compreende colocar uma célula neoplástica em contato com uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, tal contato pode induzir a produção de pelo menos um neoantígeno.

[0020] Em algumas modalidades, é fornecido no presente documento um método para induzir pelo menos um neoantígeno e/ou uma resposta de célula T em um indivíduo que tem ou é suspeito de ter um distúrbio neoplástico, que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0021] Em algumas modalidades, é fornecido no presente documento um método de tratamento de um indivíduo que tem ou é suspeito de ter um distúrbio neoplástico. Em certas modalidades, o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, a administração de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, induz pelo menos um neoantígeno e/ou uma resposta de célula T.

[0022] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos no presente documento podem compreender adicionalmente administrar pelo menos uma terapia adicional. Em algumas modalidades, os métodos fornecidos no presente documento podem resultar em toxicidade sistêmica mais baixa e/ou tolerância aprimorada.

[0023] Em outras modalidades, é fornecido no presente documento um método de tratamento de um indivíduo que tem ou suspeita ter um distúrbio neoplástico. Em algumas modalidades, o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal

farmaceuticamente aceitável do mesmo, sendo que a administração pode resultar na indução de pelo menos um neoantígeno e/ou uma resposta de célula T. Em algumas modalidades, o método também pode compreender detectar um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T no indivíduo após a administração de Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, o método também pode compreender continuar a administração de Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, se um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T forem detectados.

[0024] Em algumas modalidades, é fornecido no presente documento um método de tratamento de um indivíduo que tem ou é suspeito de ter um distúrbio neoplástico, que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[0025] Em algumas modalidades dos métodos fornecidos no presente documento, o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, é administrado por si só ou como uma porção química de fármaco de um conjugado (por exemplo, qualquer um dos conjugados exemplificativos revelados no presente documento). Em algumas modalidades, o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, é administrado como uma composição que compreende múltiplas cópias do composto ou múltiplas cópias de um conjugado que compreende o composto. Essas composições são reveladas no presente documento.

[0026] Em algumas modalidades, é fornecido no presente documento uma vacina de neoantígeno que compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno. Em algumas modalidades, o pelo menos um peptídeo de neoantígeno compreende uma sequência de neoantígenos modificada ou inovadora induzida colocando-se uma célula neoplástica em contato com uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0027] As Figuras 1A a 1C mostram o efeito antitumoral da administração de Composto 1 como uma única monoterapia, um anticorpo anti-CTLA4 como uma monoterapia e Composto 1 e um anticorpo anti-CTLA4 como uma terapia de combinação.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE MODALIDADES ILUSTRATIVAS

[0028] As composições e métodos revelados podem ser entendidos mais prontamente a título de referência à seguinte descrição detalhada considerada em conjunto com as figuras anexas, que fazem parte desta revelação.

[0029] Ao longo deste texto, as descrições se referem a composições e métodos de uso das composições. Quando a revelação descreve ou reivindica uma característica ou modalidade associada a uma composição, tal característica ou modalidade é igualmente aplicável aos métodos de uso da composição. De modo semelhante, quando a revelação descreve ou reivindica uma característica ou modalidade associada a um método de uso de uma composição, tal característica ou modalidade é igualmente aplicável à composição.

[0030] Quando uma faixa de valores é expressa, ela inclui modalidades que usam qualquer valor específico dentro da faixa. Além disso, a referência aos valores indicados nas faixas inclui cada um dos valores dentro dessa faixa. Todas as faixas incluem seus parâmetros e podem ser combináveis. Quando os valores forem expressos como aproximações, pelo uso do antecedente "cerca de", será entendido que o valor específico forma uma outra modalidade. A referência a um determinado valor numérico inclui pelo menos esse valor específico, a menos que o contexto indique claramente o contrário. O uso de "ou" significará "e/ou" a menos que o contexto específico de seu uso indique o contrário. Todas as referências citadas no presente documento estão incorporadas a título de referência para qualquer propósito. Quando uma referência e o relatório descritivo estiverem em conflito, o relatório

descritivo prevalecerá.

[0031] Deve-se considerar que determinadas características das composições e métodos revelados que são, para maior clareza, descritas no presente documento no contexto de modalidades separadas, também podem ser fornecidas em combinação em uma única modalidade. Por outro lado, várias características das composições e métodos revelados que são, por uma questão de brevidade, descritos no contexto de uma única modalidade, também podem ser fornecidas separadamente ou em qualquer subcombinação.

Definições

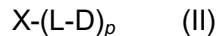
[0032] Vários termos relacionados a aspectos da descrição são usados ao longo do relatório descritivo e das reivindicações. Tais termos devem ter seu significado comum na técnica, exceto onde indicado em contrário. Outros termos especificamente definidos devem ser interpretados de uma maneira consistente com as definições fornecidas no presente documento.

[0033] Conforme usado no presente documento, as formas no singular "um", "uma", "o" e "a" incluem formas no plural exceto onde o contexto indicar claramente em contrário.

[0034] Os termos "cerca de" ou "aproximadamente" no contexto de valores e faixas numéricas se referem a valores ou faixas que se aproximam ou estão próximos dos valores ou faixas recitados, de modo que a modalidade possa ter o desempenho pretendido, como ter uma quantidade desejada de ácidos nucleicos ou polipeptídeos em uma mistura de reação, como é evidente para o versado na técnica a partir dos ensinamentos contidos no presente documento. Em algumas modalidades, cerca de significa mais ou menos 10% de uma quantidade numérica.

[0035] O termo "conjugado", conforme usado no presente documento, se refere a um ou mais compostos terapêuticos (por exemplo, Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo) ligados a um ou mais agentes de ligação de célula, e é definido pela Fórmula genérica: X-(L-

$D)_p$ (Fórmula II), em que X = um agente de ligação de célula, L = uma porção química de ligante, D = uma porção química de fármaco (por exemplo, Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo), e p = o número de porções químicas de fármaco por agente de ligação de célula. Em conjugados que compreendem uma porção química de fármaco de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, " p " se refere ao número de porções químicas de fármaco ligadas ao agente de ligação de célula. Um conjugado exemplificativo é um conjugado de Fórmula II:



em que

X é um agente de ligação de célula que alveja uma célula neoplásica;

D é o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo;

L é um ligante que liga covalentemente X a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15.

[0036] Em algumas modalidades, o ligante L é um ligante clivável. Em algumas modalidades, o ligante L pode incluir uma porção química clivável entre o agente de ligação de célula e o composto terapêutico. Em algumas modalidades, o ligante L pode incluir uma porção química clivável que pode ser ligada a um ou ambos dentre o agente de ligação de célula e o composto terapêutico por unidade (ou unidades) espaçadora. Em algumas modalidades, quando uma unidade espaçadora liga a porção química clivável ao composto terapêutico, a mesma é uma unidade espaçadora autoimolativa. Em algumas modalidades, o ligante L não inclui uma porção química clivável e é um ligante não clivável. Em algumas modalidades, o ligante L pode incluir pelo menos uma unidade espaçadora que pode se ligar diretamente ao agente de ligação de célula e ao composto terapêutico.

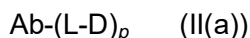
[0037] Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula X compreende um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula X compreende um peptídeo. Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula X compreende um receptor ou um fragmento de receptor que interage com um antígeno, por exemplo, um antígeno expresso de maneira exclusiva, predominante ou preferencial em uma célula cancerosa.

[0038] Tal como usado no presente documento, o termo "agente de ligação celular" se refere a qualquer agente que tenha capacidade de se ligar a uma célula animal (por exemplo, humana) e entregar uma porção química de fármaco (por exemplo, o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo). O termo abrange anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno (por exemplo, anticorpos monoclonais e fragmentos dos mesmos como Fabs e scFVs). O termo engloba, adicionalmente, peptídeos e outros agentes de ligação de célula exemplificativos. Por exemplo, em algumas modalidades, um agente de ligação de célula pode ser um anticorpo, um fragmento de ligação a antígeno, um peptídeo, ou qualquer um dentre uma variedade de arcabouços sem anticorpos (por exemplo, DARPins, duocorpos, peptídeos bicíclicos, nanocorpos, centirinas, MSH (hormônio estimulante de melanócito), moléculas de fusão de receptor-Fc, estruturas de receptor de célula T, hormônios esteroides, tais como andrógenos e estrógenos, fatores de crescimento e fatores estimulantes de colônia, tais como EGF). Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula compreende um DARPIn, um duocorpo, um peptídeo bicíclico, um nanocorpo, uma centirina, MSH (hormônio estimulante de melanócito), uma molécula de fusão de receptor-Fc, uma estrutura de receptor de célula T, um hormônio esteroide, um fator de crescimento ou um fator estimulante de colônia. Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula compreende um arcabouço sem anticorpos. Em algumas modalidades, os arcabouços sem anticorpos podem estar incluídos amplamente em duas classes estruturais, ou seja, compostos dimensionados por domínio (aproximadamente 6 a 20 kDa) e peptídeos restritos (aproximadamente 2 a 4 kDa). Arcabouços dimensionados por domínio

exemplificativos incluem, porém sem limitação, aficorpos, afillinas, anticalinas, atrímeros, DARPin, arcabouços FN3 (por exemplo, adnectinas e centirinas), finômeros, domínios Kunitz, pronectinas, O-corpos e proteínas de fusão de receptor-Fc, enquanto peptídeos restritos exemplificativos incluem avímeros, peptídeos bicíclicos e nós Cys. Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula compreende um arcabouço dimensionado por domínio. Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula e/ou arcabouço dimensionado por domínio é um aficorpo, uma afillina, uma anticalina, um atrímero, um DARPin, um arcabouço de FN3, um finômero, um domínio de Kunitz, uma pronectina, um O-corpo, ou uma proteína de fusão de receptor-Fc. Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula compreende um peptídeo restrito. Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula e/ou peptídeo restrito é um avímero, um peptídeo bicíclico ou um nó Cys. Os arcabouços sem anticorpos são revisados, por exemplo, em Vazquez-Lombardi et al. (2015) *Drug Dis Today* 20(10):1,271 a 1283.

[0039] Os termos "conjugado de anticorpo-fármaco" e "ADC" são usados intercambiavelmente, e se referem a um ou mais compostos terapêuticos (por exemplo, Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo) ligados a um ou mais anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno, e são definidos pela Fórmula genérica: **Ab-(L-D)_p** (Fórmula II(a)), em que Ab = um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, L = uma porção química de ligante, D = uma porção química de fármaco (por exemplo, Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo), e *p* = o número de porções químicas de fármaco por anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno. Em ADCs que compreendem uma porção química de fármaco de Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, "*p*" se refere ao número de porções químicas de fármaco ligadas ao anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno. Um ADC exemplificativo é um ADC de Fórmula II(a):



em que

Ab é um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo que alveja uma célula neoplástica;

D é o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo;

L é um ligante que liga covalentemente Ab a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15.

[0040] Em algumas modalidades, o ligante L é um ligante clivável. Em algumas modalidades, o ligante L pode incluir uma porção química clivável entre o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno e o composto terapêutico. Em algumas modalidades, o ligante L pode incluir uma porção química clivável que pode ser ligada a um ou ambos o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno e composto terapêutico por unidade espaçadora (ou unidades espaçadoras). Em algumas modalidades, quando uma unidade espaçadora liga a porção química clivável ao composto terapêutico, a mesma é uma unidade espaçadora autoimolativa. Em algumas modalidades, o ligante L não inclui uma porção química clivável e é um ligante não clivável. Em algumas modalidades, o ligante L pode incluir pelo menos uma unidade espaçadora que pode se ligar diretamente ao anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno e ao composto terapêutico.

[0041] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno Ab é um anticorpo de quatro cadeias (também chamado de uma imunoglobulina ou um anticorpo de comprimento total ou intacto), que compreende duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno Ab é um meio corpo de duas cadeias (uma cadeia leve e uma cadeia pesada) ou um fragmento de ligação a antígeno de uma imunoglobulina. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno Ab é um fragmento de ligação a antígeno de uma imunoglobulina que retém a capacidade de se ligar a um antígeno de câncer-alvo e/ou fornecer uma função de uma imunoglobulina. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento

de ligação a antígeno Ab tem capacidade para ligar um antígeno de câncer-alvo com alta especificidade e alta afinidade. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno Ab é um anticorpo internalizante ou fragmento de ligação a antígeno internalizante do mesmo.

[0042] Em algumas modalidades, o anticorpo internalizante ou fragmento de ligação a antígeno internalizante do mesmo se liga a um antígeno de câncer-alvo expresso na superfície de uma célula e entra na célula após a ligação. Em algumas modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é liberado do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do ADC após o ADC entrar e estar presente em uma célula que expressa o antígeno de câncer-alvo (isto é, após o ADC ter sido internalizado), por exemplo, por clivagem, por degradação do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno, ou por qualquer mecanismo de liberação adequado (por exemplo, ação enzimática, hidrólise, oxidação).

[0043] O termo "anticorpo" é usado em seu sentido mais amplo para se referir a uma molécula de imunoglobulina que reconhece e se liga especificamente a um alvo, como uma proteína, polipeptídeo, carboidrato, polinucleotídeo, lipídeo, ou combinações dos itens anteriormente mencionados através de pelo menos um sítio de reconhecimento de antígeno dentro da região variável da molécula de imunoglobulina. A cadeia pesada de um anticorpo é composta por um domínio variável de cadeia pesada (V_H) e uma região constante de cadeia pesada (C_H). A cadeia leve é composta por um domínio variável de cadeia leve (V_L) e um domínio constante de cadeia leve (C_L). Com os propósitos deste pedido, os domínios variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve maduros compreendem, cada um, três regiões determinantes de complementaridade (CDR1, CDR2 e CDR3) dentro de quatro regiões de estrutura (FR1, FR2, FR3 e FR4) dispostas a partir da terminação N até a terminação C: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. Um "anticorpo" pode ser de ocorrência natural ou artificial, como anticorpos monoclonais produzidos por tecnologia de hibridoma convencional. O termo "anticorpo"

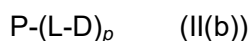
inclui anticorpos monoclonais de comprimento total e anticorpos policlonais de comprimento total, bem como fragmentos de anticorpo como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv e anticorpos de cadeia única. Um anticorpo pode ser uma das cinco principais classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, ou subclasses das mesmas (por exemplo, isótipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). O termo abrange adicionalmente anticorpos humanos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e qualquer molécula de imunoglobulina modificada contendo um sítio de reconhecimento de antígeno, desde que demonstre a atividade biológica desejada (por exemplo, se ligue ao antígeno-alvo, se internalize dentro de uma célula de expressão de antígeno-alvo).

[0044] O termo "fragmento de ligação a antígeno" ou "porção de ligação a antígeno" de um anticorpo, conforme usado no presente documento, se refere a um ou mais fragmentos de um anticorpo ou proteína que retém a habilidade para se ligar especificamente a um antígeno. Os fragmentos de ligação a antígeno também podem reter a capacidade de internalizar em uma célula que expressa o antígeno. Em algumas modalidades, os fragmentos de ligação a antígeno também retêm a atividade imunoefetora. Foi demonstrado que fragmentos de um anticorpo de comprimento total podem realizar a função de ligação a antígeno de um anticorpo de comprimento total. Exemplos de fragmentos de ligação abrangidos pelo termo "fragmento de ligação a antígeno" ou "porção de ligação a antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios V_L, V_H, C_L e C_{H1}; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd que consiste nos domínios V_H e C_{H1}; (iv) um fragmento Fv que consiste nos domínios V_L e V_H de um único braço de um anticorpo; (v) um fragmento dAb, que compreende um único domínio variável, por exemplo, um domínio V_H (consultar, por exemplo, Ward et al. (1989) Nature 341:544 a 546; e o documento nº WO 1990/005144); e (vi) uma região determinante de complementaridade (CDR) isolada. Além disso, embora os dois domínios dos

fragmentos V_F , V_L e V_H , sejam codificados por genes separados, os mesmos podem ser unidos pelo uso de métodos recombinantes, por um vinculador sintético que permite que os mesmos sejam fabricados como uma única cadeia de proteína na qual o par de regiões V_L e V_H para formar moléculas monovalentes (conhecidas como F_V de cadeia única (scFv)). Consultar, por exemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423 a 426; e Huston et al. (1988) Proc Natl Acad Sci. E.U.A. 85:5,879 a 5,883. Tais anticorpos de cadeia única também se destinam a ser abrangidos pelo termo "fragmento de ligação a antígeno" ou "porção de ligação a antígeno" de um anticorpo e são conhecidos na técnica como um tipo exemplificativo de fragmento de ligação que pode internalizar nas células após a ligação (consultar, por exemplo, Zhu et al. (2010)9:2131-41; He et al. (2010) J Nucl Med. 51:427-32; e Fitting et al. (2015) MAbs 7:390-402). Em certas modalidades, as moléculas de scFv podem ser incorporadas a uma proteína de fusão. Outras formas de anticorpos de cadeia única, como diacorpos, também são abrangidas. Diacorpos são anticorpos bivalentes biespecíficos em que os domínios V_H e V_L são expressos em uma única cadeia polipeptídica, porém, com o uso de um ligante que é muito curto para permitir o pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, assim, se induz o pareamento dos domínios com domínios complementares de outra cadeia e a criação de dois sítios de ligação a antígeno (consultar, por exemplo, Holliger et al. (1993) Proc Natl Acad Sci. E.U.A. 90:6,444 a 6,448; e Poljak et al. (1994) Structure 2:1,121 a 1,123). Os fragmentos de ligação a antígeno são obtidos com o uso de técnicas convencionais conhecidas pelos versados na técnica, e os fragmentos de ligação são analisados quanto à utilidade (por exemplo, afinidade de ligação, internalização) da mesma maneira que os anticorpos intactos. Os fragmentos de ligação a antígeno podem ser preparados por clivagem da proteína intacta, por exemplo, por protease ou clivagem química.

[0045] Os termos "conjugado de peptídeo-fármaco" e "PDC" são usados intercambiavelmente, e se referem a um ou mais compostos

terapêuticos (por exemplo, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo) ligados a um ou mais peptídeos, e são definidos pela Fórmula genérica: $P-(L-D)_p$ (Fórmula II(b)), em que P = um peptídeo (por exemplo, um peptídeo linear ou cíclico), L = uma porção química de ligante, D = uma porção química de fármaco (por exemplo, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo), e p = o número de porções químicas de fármaco por peptídeo. Em PDCs que compreendem uma porção química de fármaco do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, " p " se refere ao número de porções químicas de fármaco ligadas ao peptídeo. Um PDC exemplificativo é um PDC de Fórmula II(b):



em que

P é um peptídeo que alveja uma célula neoplástica;

D é o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo;

L é um ligante que liga covalentemente P a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15.

[0046] Em algumas modalidades, o ligante L é um ligante clivável. Em algumas modalidades, o ligante L pode incluir uma porção química clivável entre o peptídeo e o composto terapêutico. Em algumas modalidades, o ligante L pode incluir uma porção química clivável que pode ser ligada a um ou ambos dentre o peptídeo e o composto terapêutico por unidade (ou unidades) espaçadora. Em algumas modalidades, quando uma unidade espaçadora liga a porção química clivável ao composto terapêutico, a mesma é uma unidade espaçadora autoimolativa. Em algumas modalidades, o ligante L não inclui uma porção química clivável e é um ligante não clivável. Em algumas modalidades, o ligante L pode incluir pelo menos uma unidade espaçadora que pode se ligar diretamente ao peptídeo e ao composto terapêutico.

[0047] Em algumas modalidades, o peptídeo P tem capacidade para ligar um antígeno de câncer-alvo com alta especificidade e alta afinidade.

Em algumas modalidades, o antígeno de câncer-alvo alvejado pelo peptídeo é expresso na superfície celular e não dentro do citosol ou núcleo. Em algumas modalidades, o peptídeo P é um peptídeo linear. Em algumas modalidades, o peptídeo P é um peptídeo cíclico. Em algumas modalidades, o peptídeo P é menor que cerca de 250, cerca de 200, cerca de 150, cerca de 100, cerca de 50, cerca de 30, cerca de 20, cerca de 10, ou cerca de 5 aminoácidos em comprimento. Em algumas modalidades, o peptídeo P é menor que cerca de 100, cerca de 50, cerca de 30, cerca de 20, cerca de 10, ou cerca de 5 aminoácidos em comprimento.

[0048] Conforme usado no presente documento, o termo "peptídeo" se refere a um polímero de resíduos de aminoácido. O termo engloba polímeros de aminoácido que compreendem dois ou mais aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas, polímeros de aminoácido nos quais um ou mais resíduos de aminoácido são uma substância mimética química artificial de um aminoácido de ocorrência natural correspondente, assim como polímeros de aminoácido de ocorrência natural e polímeros de aminoácido de ocorrência não natural. O termo inclui, por exemplo, fragmentos biologicamente ativos, polipeptídeos substancialmente homólogos, oligopeptídeos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipeptídeos, polipeptídeos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusão, entre outros. Os termos também incluem peptídeos naturais, peptídeos recombinantes, peptídeos sintéticos ou uma combinação dos mesmos.

[0049] "Internalização", conforme usado no presente documento, em referência a um agente de ligação de célula (por exemplo, um anticorpo, fragmento de ligação a antígeno, peptídeo, receptor ou fragmento de receptor) se refere a um agente de ligação de célula que tem capacidade para ser levado pela membrana de bicamada lipídica da célula até um compartimento interno (isto é, "internalizado") mediante ligação à célula, preferencialmente para um compartimento degradante na célula. Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula usado nos conjugados revelados no presente documento

alveja um antígeno de superfície celular e é um agente de ligação de célula internalizante (isto é, o conjugado se transfere através da membrana celular após ligação de antígeno). Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula internalizante liga um receptor na superfície celular. Um agente de ligação de célula internalizante que alveja um receptor na membrana celular pode induzir endocitose mediada por receptor. Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula internalizante é levado para a célula por meio de endocitose mediada por receptor.

[0050] "Não internalização", conforme usado no presente documento, em referência a um agente de ligação de célula (por exemplo, um anticorpo, fragmento de ligação a antígeno, peptídeo, receptor, ou fragmento de receptor), se refere a um agente de ligação de célula que permanece na superfície celular mediante ligação à célula. Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula usado nos conjugados revelados no presente documento alveja um antígeno de superfície celular e é um agente de ligação de célula de não internalizante (isto é, o conjugado permanece na superfície celular e não se transfere através da celular membrana após ligação de antígeno). Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula de não internalizante se liga a um receptor de não internalizante ou outro antígeno de superfície celular. Antígenos de superfície celular não internalizantes exemplificativos incluem, porém, sem limitação, CA125 e CEA, e os agentes de ligação celular que se ligam a alvos de antígenos não internalizantes também são conhecidos na técnica (consultar, por exemplo, Bast et al. (1981) *J Clin Invest.* 68(5):1,331 a 1,337; Scholler e Urban (2007) *Biomark Med.* 1(4):513 a 523; e Boudousq et al. (2013) *PLoS One* 8(7):e69613).

[0051] Um "ligante" ou "porção química de ligante" é usado no presente documento para se referir a qualquer porção química que tenha capacidade para unir covalentemente um composto, normalmente uma porção química de fármaco, tal como o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, a outra porção química, tal como um agente de ligação de

célula (por exemplo, um anticorpo, fragmento de ligação a antígeno, peptídeo, receptor ou fragmento de receptor). Ligantes podem ser suscetíveis ou substancialmente resistentes à clivagem induzida por peptidase, clivagem induzida por ácido, clivagem com base leve, clivagem induzida por esterase e/ou clivagem de ligação de dissulfeto, em condições sob as quais o composto e/ou o agente de ligação de célula permanecem ativos. Por exemplo, um ligante pode ser "clivável" ou "não clivável" (Ducry e Stump (2010) Bioconjugate Chem. 21:5 a 13). Ligantes cliváveis são projetados para liberar a porção química de fármaco (por exemplo, o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo) quando submetidos a certos fatores ambientais, por exemplo, quando internalizados na célula-alvo, enquanto ligantes não cliváveis dependem, de modo geral, da degradação do próprio agente de ligação de célula.

[0052] Em algumas modalidades, o ligante é um ligante não clivável. Em algumas modalidades, a porção química de fármaco de um conjugado revelado no presente documento (por exemplo, Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo) é liberada através da degradação do agente de ligação de célula. Os ligantes não cliváveis tendem a permanecer covalentemente associados a pelo menos um aminoácido do agente de ligação de célula e do fármaco após internalização e degradação na célula alvo. Ligantes não cliváveis exemplificativos podem compreender tioéter, ciclohexila, ciclo-hexano-1 carboxilato de N-succinimidil 4-(N-maleimidometila) (SMCC), N-hidroxissuccinimida (NHS), uma ou mais porções químicas de polietilenoglicol (PEG), ou uma ou mais porções químicas de alquila.

[0053] Em algumas modalidades, o ligante é um ligante clivável. Um ligante clivável se refere a qualquer ligante que compreende uma porção química clivável. Como usado no presente documento, o termo "porção química clivável" se refere a qualquer ligação química que pode ser clivada. As ligações químicas cliváveis adequadas são bem conhecidas na técnica e incluem, porém sem limitação, ligações lábeis de ácido, ligações lábeis de

protease/peptidase, ligações fotolábeis, ligações dissulfeto e ligações lábeis de esterase. Ligantes que compreendem uma porção química clivável podem permitir a liberação da porção química de fármaco (por exemplo, o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo) a partir do conjugado por meio de clivagem em um sítio particular no ligante. Em algumas modalidades, o ligante e/ou a porção química clivável compreende uma porção química de peptídeo clivável, isto é, qualquer ligação química que liga aminoácidos (derivados de aminoácido naturais ou sintéticos) que pode ser clivada por um agente que está presente no ambiente intracelular.

[0054] Em algumas modalidades, o ligante é clivável sob condições intracelulares, de modo que a clivagem do ligante libere de maneira suficiente a porção química de fármaco (por exemplo, o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo) a partir do agente de ligação de célula no ambiente intracelular para ativar o fármaco e/ou tornar o fármaco terapeuticamente eficaz. Em algumas modalidades, a porção química de fármaco não é clivada a partir do agente de ligação de célula até que o conjugado entre em uma célula que expressa um antígeno específico para o agente de ligação de célula do conjugado, e a porção química de fármaco é clivada a partir do agente de ligação de célula mediante entrada na célula. Em algumas modalidades, o ligante compreende uma porção química clivável que está posicionada de modo que nenhuma parte do ligante ou do agente de ligação de célula permaneça ligada à porção química de fármaco mediante clivagem. Ligantes cliváveis exemplificativos incluem ligantes sensíveis a protease/peptidase, ligantes sensíveis a pH (por exemplo, ácido lábil e/ou ligantes hidrolisáveis), ligantes fotolábeis, ligantes que contêm dimetila, dissulfeto ou sulfonamida.

[0055] Em algumas modalidades, o ligante pode ser um ligante do tipo dendrítico para ligação covalente de mais de uma porção química de fármaco (por exemplo, o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo) a um agente de ligação de célula através de uma ramificação,

porção química de ligante multifuncional. *Consultar, por exemplo*, Sun et al. (2002) *Bioorg Med Chem Lett.* 12:2,213 a 2,215; e Sun et al. (2003) *Bioorg Med Chem.* 11:1,761 a 1,768. Ligantes dendríticos podem aumentar a razão molar de fármaco para agente de ligação de célula, isto é, carregamento de fármaco, que está relacionado à potência do conjugado. Assim, quando um agente de ligação de célula carrega apenas um grupo tiol cisteína reativo, por exemplo, uma multiplicidade de porções químicas de fármaco podem ser ligadas através de um ligante dendrítico. Em algumas modalidades, a porção química de ligante ou porção química de fármaco e ligante pode ser ligada ao agente de ligação de célula por meio de química de ponte de dissulfeto reduzida ou tecnologia de utilização de lisina limitada. *Consultar, por exemplo*, os documentos nº WO 2013/173391 e WO 2013/173393.

[0056] Os documentos nº WO 2017/151979, U.S. 2017/0252458, e U.S. 2018/0193478 fornecem e estão incorporados no presente documento a título de referência para todos os ligantes exemplificativos, pontos de ligação de ligante exemplificativos para agentes de ligação de célula (por exemplo, anticorpos), e agentes de ligação de célula exemplificativos (por exemplo, anticorpos).

[0057] Em algumas modalidades, o ligante em qualquer um dos conjugados revelados no presente documento pode compreender pelo menos uma unidade espaçadora que une o agente de ligação de célula à porção química de fármaco (por exemplo, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo). Em algumas modalidades, uma unidade espaçadora entre o agente de ligação de célula e a porção química clivável, quando presente, une um sítio de clivagem (por exemplo, uma porção química de peptídeo clivável) no ligante ao agente de ligação de célula. Em algumas modalidades, uma unidade espaçadora entre a porção química de fármaco e a porção química clivável, quando presente, une um sítio de clivagem (por exemplo, uma porção química de peptídeo clivável) no ligante à porção química de fármaco. Em algumas modalidades, nenhum sítio de clivagem está

presente, e a unidade espaçadora é usada para ligar o agente de ligação de célula à porção química de fármaco.

[0058] Uma unidade espaçadora pode ser "autoimolativa" ou "não autoimolativa". Uma unidade espaçadora "não autoimolativa" é uma na qual toda ou parte da unidade espaçadora permanece ligada à porção química de fármaco (por exemplo, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo) mediante clivagem do ligante. Exemplos de unidades espaçadoras não autoimolativas incluem, porém sem limitação, uma unidade espaçadora de glicina e uma unidade espaçadora de glicina-glicina. As unidades espaçadoras não autoimolativas podem eventualmente se degradar ao longo do tempo, mas não liberam prontamente uma porção química de fármaco nativa ligada inteiramente sob condições celulares. Uma unidade espaçadora "autoimolativa" permite a liberação da porção química de fármaco nativa sob condições intracelulares. Um "fármaco nativo" ou "porção química de fármaco nativa" é aquela em que nenhuma parte da unidade espaçadora ou outra modificação química permanece após a clivagem/degradação da unidade espaçadora.

[0059] O carregamento de fármaco é representado por p . O termo " p " ou "carregamento de fármaco" se refere ao número de porções químicas de fármaco por agente de ligação de célula, isto é, o número de porções químicas -L-D por agente de ligação de célula (X), por exemplo, em conjugados de Fórmula II. O termo também pode se referir ao número de porções químicas L-D por anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno (Ab), por exemplo, em ADCs de Fórmula II(a), ou ao número de porções químicas L-D por peptídeo (P), por exemplo, em PDCs de Fórmula II(b). Por exemplo, em conjugados de Fórmula II, se dois compostos (por exemplo, dois compostos que têm, cada um, a estrutura de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo) estão ligados a um agente de ligação de célula, $p = 2$. Em algumas modalidades, p é um número inteiro de 1 a 15. Em algumas modalidades, p é um número inteiro de 1 a 10, 1 a 8 ou 1 a 4. Em algumas modalidades, p é um número inteiro de 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3 ou 1 a 2.

Em algumas modalidades, p é um número inteiro de 2 a 10, 2 a 9, 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, 2 a 5, 2 a 4 ou 2 a 3. Em algumas modalidades, p é um número inteiro de 2 a 3. Em algumas modalidades, p é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8.

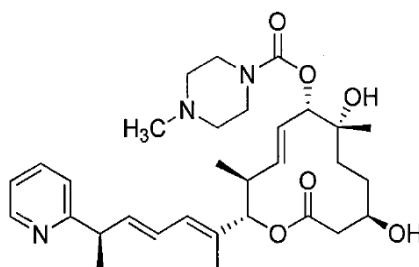
[0060] Em composições que compreendem múltiplas cópias de conjugados, por exemplo, conjugados de Fórmula II, " p médio" se refere ao número médio de porções químicas -L-D por agente de ligação de célula, também denominado "carregamento de fármaco médio".

[0061] O termo "agente quimioterápico" ou "agente anticâncer" é usado no presente documento para se referir a todos os agentes que são eficazes no tratamento de câncer, independentemente do mecanismo de ação. A inibição de metástase ou angiogênese é frequentemente uma propriedade de um agente quimioterápico. Os agentes quimioterápicos incluem anticorpos, moléculas biológicas e moléculas pequenas e abrangem os compostos moduladores de splicing descritos no presente documento. Um agente quimioterápico pode ser um agente citotóxico ou citostático. O termo "agente citostático" se refere a um agente que inibe ou suprime o crescimento celular e/ou multiplicação de células. O termo "agente citotóxico" se refere a uma substância que causa a morte celular principalmente por interferir na atividade de expressão e/ou funcionamento de uma célula.

[0062] O termo "Composto 1" ou "Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo", conforme usado no presente documento, se refere a pelo menos uma entidade escolhida dentre compostos de Fórmula I e sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos. Além disso, a menos que seja afirmado de outra forma, "Compostos de Fórmula I" podem ser uma ou mais dentre as formas enantioméricas, diastereoisoméricas e/ou geométricas (ou conformacionais) do composto (ou compostos); por exemplo, as configurações R e S para cada centro assimétrico, isômeros de ligação dupla (Z) e (E) e isômeros conformacionais (Z) e (E). A menos que seja afirmado de outra forma, compostos representados no presente documento que coexistem com as formas tautoméricas estão inseridas no escopo da

revelação. Adicionalmente, a menos que seja afirmado de outra forma, as estruturas representadas no presente documento também devem incluir compostos que diferem apenas na presença de um ou mais átomos isotopicamente enriquecidos. Por exemplo, compostos que têm as estruturas representadas exceto pela substituição de hidrogênio por deutério ou trítio, ou pela substituição de um carbono por um carbono enriquecido ^{13}C ou ^{14}C estão inseridos no escopo desta revelação. Tais compostos podem ser úteis, por exemplo, como ferramentas analíticas ou sondas em ensaios biológicos.

[0063] Fórmula I pode ser representada pelo seguinte:



e/ou o nome químico 4-metilpiperazina-1-carboxilato de (2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-di-hidroxi-3,7-dimetil-12-oxo-2-((R,2E,4E)-6-(piridin-2-il)hepta-2,4-dien-2-il)oxaciclododec-4-en-6-ila.

[0064] O termo "inibir" ou "inibição de", como usado no presente documento, significa reduzir em uma quantidade mensurável e pode incluir, mas não exige prevenção ou inibição completa.

[0065] Os termos "distúrbio neoplásico" e "câncer" são usados no presente documento de forma intercambiável para se referir à presença de células que têm características típicas de células causadoras de câncer, como proliferação descontrolada, imortalidade, potencial metastático, crescimento rápido e taxa de proliferação e/ou determinadas características morfológicas. Frequentemente, as células cancerosas podem estar sob a forma de um tumor ou massa, mas essas células podem existir sozinhas em um indivíduo ou podem circular na corrente sanguínea como células independentes, como

células leucêmicas ou de linfoma. Os termos "distúrbio neoplásico" e "câncer" incluem todos os tipos de cânceres e metástases de câncer, incluindo malignidade hematológica, tumores sólidos, sarcomas, carcinomas e outros cânceres de tumor sólido e não sólido. As neoplasias hematológicas podem incluir neoplasias de células B, cânceres do sangue (leucemias), cânceres de células plasmáticas (mielomas, por exemplo, mieloma múltiplo) ou cânceres dos gânglios linfáticos (linfomas). As malignidades de células B exemplificativas incluem leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma folicular, linfoma de células do manto e linfoma difuso de grandes células B. As leucemias podem incluir leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielogênica aguda (AML), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia mieloide crônica (CML), leucemia mielomonocítica crônica (CMML), leucemia monocítica aguda (AMoL), etc. Os linfomas podem incluir linfoma de Hodgkin e linfoma não Hodgkin. Outras malignidades hematológicas podem incluir síndrome mielodisplásica (MDS). Os tumores sólidos incluem carcinomas como adenocarcinoma, por exemplo, câncer de mama, câncer de pâncreas, câncer de próstata, câncer de cólon ou colorretal, câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer cervical, câncer endometrial, câncer de ovário, colangiocarcinoma, glioma, melanoma, etc.

[0066] Os termos "tumor" e "neoplasma" se referem a qualquer massa de tecido que resulte do crescimento excessivo ou proliferação celular, benigna ou maligna, incluindo lesões pré-cancerosas.

[0067] Os termos "célula tumoral" e "célula neoplásica" são usados de forma intercambiável e se referem a células individuais ou à população total de células derivadas de um tumor ou neoplasma, incluindo células não tumorigênicas e células-tronco cancerosas. Como usado no presente documento, o termo "célula tumoral" será modificado pelo termo "não tumorigênico" quando se refere apenas às células tumorais sem a capacidade de renovação e diferenciação para distinguir essas células tumorais de células-tronco cancerosas.

[0068] Os termos "indivíduo" e "paciente" são usados de forma

intercambiável no presente documento para se referir a qualquer animal, como qualquer mamífero, incluindo, porém sem limitação, seres humanos, primatas não humanos, roedores e similares. Em algumas modalidades, o mamífero é um camundongo. Em algumas modalidades, o mamífero é um ser humano. Em algumas modalidades, o indivíduo é um camundongo. Em algumas modalidades, o indivíduo é um ser humano.

[0069] O termo "coadministração" ou administração "em combinação com" um ou mais agentes terapêuticos inclui a administração simultânea e a administração consecutiva em qualquer ordem.

[0070] Uma "composição farmacêutica" se refere a uma preparação que está em uma forma para permitir a administração e, subsequentemente, fornecer a atividade biológica pretendida do ingrediente ativo (ou ingredientes ativos) e/ou para obter um efeito terapêutico, e que não contém componentes adicionais que são inaceitavelmente tóxicos para um indivíduo ao qual a formulação seria administrada. A composição farmacêutica pode ser estéril.

[0071] Um "excipiente farmacêutico" compreende um material como um adjuvante, um carreador, agentes de ajuste e tampão de pH, agentes de ajuste de tonicidade, agentes umectantes, conservantes e similares.

[0072] "Farmaceuticamente aceitável" significa aprovado ou aprovável por uma agência reguladora do governo federal ou estadual, ou mencionado na Farmacopeia dos EUA ou outra farmacopeia geralmente reconhecida, para uso em animais e mais particularmente em seres humanos.

[0073] Um "sal farmacêuticamente aceitável" é um sal que retém a atividade biológica desejada do composto parente e não confere efeitos toxicológicos indesejados. Exemplos de tais sais são: (a) sais de adição ácidos formados com ácidos inorgânicos, por exemplo, ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico e similares; e sais formados com ácidos orgânicos, por exemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucônico,

ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tânico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglutâmico, ácido naftalenossulfônico, ácido metanossulfônico, ácido p-toluenossulfônico, ácido naftalenodissulfônico, ácido poligalacturônico e similares; e (b) sais formados a partir de ânions elementares, como cloro, bromo e iodo. *Consultar, por exemplo*, Haynes et al., "Commentary: Occurrence of Pharmaceutically Acceptable Anions and Cations in the Cambridge Structural Database," J Pharmaceutical Sciences, vol. 94, no. 10 (2005), e Berge et al., "Pharmaceutical Salts," J Pharmaceutical Sciences, vol. 66, no. 1 (1977), que estão incorporados a título de referência no presente documento.

[0074] O termo "quantidade eficaz", conforme usado no presente documento, se refere à quantidade de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, descrito no presente documento, que seja suficiente para realizar um propósito especificamente afirmado, por exemplo, produzir um efeito terapêutico após a administração, tal como uma redução em taxa de crescimento tumoral ou volume tumoral, uma redução em um sintoma de câncer ou alguns outros indícios de eficácia de tratamento. Um valor eficaz pode ser determinado de maneira rotineira em relação ao objetivo estabelecido. O termo "terapeuticamente quantidade eficaz" se refere a uma quantidade de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, descrito no presente documento, eficaz para eliminação detectável, redução e/ou inibição do crescimento ou espalhamento de células tumorais, do tamanho ou número de tumores, e/ou outra medição do nível, estágio, progressão e/ou gravidade do câncer. A quantidade terapêuticamente eficaz pode variar dependendo da aplicação pretendida (in vitro ou in vivo), ou do indivíduo e afecção de doença a ser tratada, por exemplo, o peso e a idade do indivíduo, a gravidade da afecção da doença, a forma de administração e similares, que pode ser facilmente determinada pelo versado na técnica. O termo também se aplica a uma dose que irá induzir uma resposta específica nas células alvo, por exemplo, inibição do crescimento celular. A dose específica pode variar

dependendo, por exemplo, da composição farmacêutica específica, do indivíduo e sua idade e condições de saúde existentes ou risco para condições de saúde, o regime de dosagem a ser seguido, a gravidade da doença, se é administrada em combinação com outros agentes, tempo de administração, o tecido ao qual é administrada e o sistema de distribuição física no qual é transportada. No caso de câncer, uma quantidade terapeuticamente eficaz de Composto 1, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, pode reduzir o número de células cancerosas, reduzir o tamanho do tumor, inibir (por exemplo, diminuir ou parar) a metástase do tumor, inibir (por exemplo, retardar ou parar) o crescimento do tumor e/ou aliviar um ou mais sintomas.

[0075] Uma “quantidade profilaticamente eficaz” se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante os intervalos de tempo necessários, para obter o resultado profilático desejado. Tipicamente, uma vez que uma dose profilática é usada em indivíduos antes ou em um estágio inicial da doença, a quantidade profilaticamente eficaz será menor do que a quantidade terapeuticamente eficaz.

[0076] Como usado no presente documento, “tratar” ou “terapêutico” e termos gramaticalmente relacionados, se referem a qualquer melhora de qualquer consequência da doença, como sobrevida prolongada, menos morbidade e/ou uma redução dos efeitos colaterais que resultam de uma modalidade terapêutica alternativa. Como é prontamente entendido na técnica, a erradicação completa da doença é abrangida, mas não é necessária para uma ação de tratamento. “Tratamento” ou “tratar”, conforme usado no presente documento, se refere à administração de um Composto 1, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, descrito no presente documento, a um indivíduo, por exemplo, um paciente. O tratamento pode ser para sanar, curar, aliviar, atenuar, alterar, remediar, melhorar, paliar, melhorar ou afetar o distúrbio, os sintomas do distúrbio ou a predisposição para o distúrbio, por exemplo, um câncer. Em algumas modalidades, além de tratar um indivíduo com uma condição, uma composição revelada no presente documento também

pode ser fornecida profilaticamente para prevenir ou reduzir a probabilidade de desenvolver essa condição.

Neoantígenos e Métodos de Uso

[0077] São revelados no presente documento, em algumas modalidades, métodos de tratamento de um paciente induzindo-se neoantígenos em células tumorais que podem ser alvejadas pelo sistema imunológico do paciente para depuração. Sem se ater à teoria, em várias modalidades, a administração de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, sozinho e/ou como parte de um conjugado ou composição, pode produzir neoantígenos que induzem uma resposta imunológica, induzem uma resposta imunológica de RNA de fita dupla, por exemplo, como resultado de retrovírus endógenos residentes em íntron reexpressos e/ou produzir neoantígenos que induzem morte celular imunogênica.

[0078] Conforme usado no presente documento, o termo "neoantígeno" se refere a qualquer antígeno ao qual o sistema imunológico não foi anteriormente exposto que surge de uma ou mais mutações de tumor específico. Mutações de tumor específico podem incluir mutações missense, mudanças de matriz de leitura, translocações e variantes de splicing de mRNA, bem como mutações que influenciam o processamento pós-traducional, como fosforilação e glicosilação. Estas mutações exemplificativas, em várias modalidades, podem ser derivadas de mudanças e/ou mutações de codificação não sinônimas que alteram o processamento de mRNA (por exemplo, splicing). Todas essas mutações exemplificativas, em várias modalidades, podem resultar em mudanças moleculares que podem ser discriminadas por um receptor de células T adequado. Em várias modalidades preferenciais, um neoantígeno exemplificativo é um neoantígeno induzido por entrega de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, sozinho e/ou como parte de um conjugado ou composição. Em várias modalidades, a entrega de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo,

sozinho e/ou como parte de um conjugado ou composição, pode induzir splicing de mRNA inovador que resulta na tradução de proteínas que representam neoantígenos aos quais o sistema imunológico não foi anteriormente exposto. Um neoantígeno pode ocorrer naturalmente ou pode ser induzido por um agente, por exemplo, um modulador de splice. Em várias modalidades, mutações de tumor específico podem ser variantes de splicing de mRNA que resultam da entrega ou administração de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, sozinho e/ou como parte de um conjugado ou composição.

[0079] Sem se ater à teoria, em várias modalidades, a administração de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, sozinho e/ou como parte de um conjugado ou composição, pode induzir splicing de mRNA que resulta na tradução de proteínas que representam neoantígenos reconhecidos pelo sistema imunológico como estranhos. Esses podem ser alvejados, por exemplo, pelas células T, o que resulta em uma resposta de hospedeiro amplificado contra as células tumorais nas quais os neoantígenos são produzidos. Além disso, sem se ater à teoria, em várias modalidades, a entrega de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, sozinho e/ou como parte de um conjugado ou composição, pode causar a reexpressão de retrovírus endógeno residente em íntron, que resulta em uma resposta imunológica de RNA de fita dupla. Ademais, sem se ater à teoria, em várias modalidades, a entrega de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, sozinho e/ou como parte de um conjugado ou composição, pode resultar em morte de célula imunogênica disparada pela liberação induzida por Composto 1 de neoantígenos mutacionalmente derivados. Em várias modalidades, a entrega de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, sozinho e/ou como parte de um conjugado ou composição, pode induzir uma resposta imunológica de RNA de fita dupla. Em várias modalidades, a resposta imunológica de RNA dupla fita pode resultar da reexpressão de retrovírus

endógenos residentes em íntrons. Em várias modalidades, a resposta imunológica de RNA dupla fita pode resultar em morte de células tumorais. Em várias modalidades, a entrega de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, sozinho e/ou como parte de um conjugado ou composição, pode induzir morte de célula imunogênica. Em várias modalidades, a morte celular imunogênica pode resultar de liberação de neoantígenos derivados de mutação e/ou uma resposta imunológica de hospedeiro contra células tumorais.

[0080] Conseqüentemente, em várias modalidades, são revelados métodos de tratamento que compreendem a indução de neoantígenos administrando-se o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em várias modalidades, o método compreende administrar uma dosagem reduzida de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em comparação com a dosagem que seria necessária ausente da indução de neoantígenos. Em algumas modalidades, o método compreende a administração de uma ou mais doses de indução iniciais para produzir neoantígenos e induzir uma resposta imunológica (por exemplo, conversão de células T virgens em células de memória), seguido de uma dosagem ou frequência de administração reduzida (ou seja, devido ao efeito combinatório de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e de alvejamento imunológico dos neoantígenos). Em algumas modalidades, o tratamento pode compreender uma combinação de administração de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, para induzir uma resposta imunológica à base de neoantígeno e pelo menos uma terapia adicional (por exemplo, uma segunda terapia anticâncer). Por exemplo, em algumas modalidades, o tratamento pode compreender uma combinação de administração de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, para induzir uma resposta imunológica à base de neoantígeno e um ou mais inibidores de ponto de verificação. Em algumas modalidades, o tratamento pode compreender uma combinação de administração de

Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, para induzir uma resposta imunológica à base de neoantígeno e uma ou mais citocinas ou análogos de citocina. Em algumas modalidades, o tratamento pode compreender uma combinação de administração de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, para induzir uma resposta imunológica à base de neoantígeno e uma ou mais vacinas de neoantígeno. Em algumas outras modalidades, o tratamento pode compreender uma combinação de administração de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, para induzir uma resposta imunológica à base de neoantígeno e células T de alvejamento de tumor geneticamente modificadas (por exemplo, CAR-T).

[0081] Em algumas modalidades, neoantígenos podem ser usados para monitorar a eficácia de tratamento com o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Por exemplo, após a administração de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, uma amostra do paciente (por exemplo, uma biopsia de tumor) pode ser obtida e examinada para neoantígenos ou para identificadores de uma resposta imunológica ou inflamatória. Tratamento adicional pode ser fornecido, por exemplo, em dosagem reduzida, se uma resposta de neoantígeno e/ou imunológica for detectada.

[0082] Em várias modalidades, são revelados métodos de tratamento que compreendem a indução de uma resposta imunológica ao RNA de fita dupla administrando-se o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0083] Em várias modalidades, são revelados métodos de tratamento que compreendem a indução de morte de célula imunogênica administrando-se o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0084] Em várias modalidades, a administração de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, pode ser combinada com

qualquer terapia anticâncer conhecida. Exemplos de estratégias de ativação imunológica atuais disponíveis para tratamento oncológico incluem, porém sem limitação, tratamento com moléculas de inibidor imunológico de ponto de verificação (ICI), tratamento com citocinas ou análogos de citocinas, vacinação com vacinas associadas a tumores e manipulação de células T de alvejamento de tumor (por exemplo, expansão de linfócitos infiltrantes de tumor ou CAR-T). Essas tecnologias são predominantemente concentradas no aumento ou indução de uma resposta imunológica a antígenos tumorais já existentes (mutações ou expressão aberrante de proteínas de superfície celular). Uma ou mais dessas estratégias podem envolver uma ou mais mutações que têm capacidade para induzir uma resposta de célula T antigênica. Por exemplo, as respostas do paciente à inibição de ponto de verificação podem se correlacionar com a carga mutacional não sinônima. Além disso, podem ser usadas abordagens de vacinas para câncer que dependem de mutações pré-existentes e da antigenicidade dessas mutações.

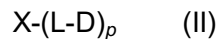
[0085] Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, pode induzir alterações de amplo alcance no transcriptoma que ocorre em múltiplas linhagens. A tradução dessas alterações de mRNA pode produzir alterações de proteínas robustas e reproduzíveis que produzem neopeptídeos de ligação a MHC1 com alta afinidade através de vários isótipos HLA. Sem se ater à teoria, devido ao alto número de alterações no transcriptoma e proteoma, o tratamento com Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, pode enriquecer o número de neoantígenos potencialmente reativos para interação aprimorada da resposta imunológica adaptativa.

[0086] Em várias modalidades dos métodos descritos no presente documento, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é administrado por si só. Em várias modalidades dos métodos descritos no presente documento, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é administrado como parte de um conjugado ou composição, por exemplo, uma composição farmacêutica que compreende o Composto 1, ou

um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, e um carreador farmacêuticamente aceitável. Em várias modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, é administrado como uma composição (por exemplo, uma composição farmacêutica) que compreende múltiplas cópias do composto. Em várias modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, é administrado como uma composição (por exemplo, uma composição farmacêutica) que compreende múltiplas cópias de um ou mais conjugados que carregam o composto. Em várias modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, é administrado como um conjugado de anticorpo-fármaco, um conjugado de peptídeo-fármaco, ou qualquer um dos conjugados exemplificativos revelados no presente documento.

[0087] Em várias modalidades dos métodos descritos no presente documento, o Composto 1, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, é administrado como parte de um conjugado.

[0088] Em algumas modalidades, o conjugado é um conjugado de Fórmula II:



em que

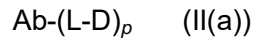
X é um agente de ligação de célula que alveja uma célula neoplástica;

D é o Composto 1, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo;

L é um ligante que liga covalentemente X a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15.

[0089] Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula compreende um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo. Em algumas modalidades, o conjugado é um conjugado de anticorpo-fármaco. Em algumas modalidades, o conjugado é um conjugado de anticorpo-fármaco de Fórmula II(a):



em que

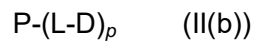
Ab é um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo que alveja uma célula neoplástica;

D é o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo;

L é um ligante que liga covalentemente Ab a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15.

[0090] Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula compreende um peptídeo. Em algumas modalidades, o conjugado é um conjugado de peptídeo-fármaco. Em algumas modalidades, o conjugado é um conjugado de peptídeo-fármaco de Fórmula II(b):



em que

P é um peptídeo que alveja uma célula neoplástica;

D é o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo;

L é um ligante que liga covalentemente P a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15.

[0091] Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula compreende um DARPin, um duocorpo, um peptídeo bicíclico, um nanocorpo, uma centirina, MSH (hormônio estimulante de melanócito), uma molécula de fusão de receptor-Fc, uma estrutura de receptor de célula T, um hormônio esteroide, um fator de crescimento ou um fator estimulante de colônia. Em algumas modalidades, o agente de ligação de célula compreende um arcabouço sem anticorpos. Em algumas modalidades, o arcabouço sem anticorpos compreende um arcabouço dimensionado por domínio ou um peptídeo restrito. Em algumas modalidades, o arcabouço dimensionado por domínio é um aficorpo, uma afillina, uma anticalina, um atrímero, um DARPin, um arcabouço de FN3, um finômero, um domínio de Kunitz, uma pronectina,

um O-corpo, ou uma proteína de fusão de receptor-Fc. Em algumas modalidades, o peptídeo restrito é um avímero, um peptídeo bicíclico ou um nó Cys.

[0092] Em algumas modalidades, L é um ligante clivável. Em algumas modalidades, L é um ligante não clivável. Em algumas modalidades, p é um número inteiro de 1 a 10. Em algumas modalidades, p é um número inteiro de 1 a 8. Em algumas modalidades, p é um número inteiro de 1 a 4.

Indução Imunológica e Regime de Tratamento:

[0093] Em várias modalidades, a presente revelação fornece um método para induzir pelo menos um neoantígeno colocando-se uma célula neoplásica em contato com uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em várias modalidades, a presente revelação fornece um método para induzir uma resposta imunológica de RNA de fita dupla colocando-se uma célula neoplásica em contato com uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em várias modalidades, a presente revelação fornece um método para induzir morte de célula imunogênica colocando-se uma célula neoplásica em contato com uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em várias modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é administrado por si só e/ou como parte de um conjugado ou composição.

[0094] Em algumas modalidades, a célula neoplásica está presente em uma cultura celular in vitro. Em algumas modalidades, a célula neoplásica é obtida a partir de um indivíduo. Em algumas modalidades, a célula neoplásica está presente em um indivíduo. Em algumas modalidades, a célula neoplásica é derivada de uma malignidade hematológica ou um tumor sólido. Em algumas modalidades, a malignidade hematológica é selecionada dentre uma malignidade de célula B, uma leucemia, um linfoma e um mieloma. Em algumas modalidades, a malignidade hematológica é selecionada dentre leucemia mieloide aguda e mieloma múltiplo. Em algumas modalidades, o

tumor sólido é selecionado dentre câncer de mama (por exemplo, câncer de mama positivo para HER2), câncer gástrico (por exemplo, adenocarcinoma gástrico), câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer uterino, carcinoma do duto salivar, melanoma, câncer de cólon e câncer de esôfago. Em algumas modalidades, o tumor sólido é selecionado dentre câncer de mama positivo para HER2, adenocarcinoma gástrico e câncer de próstata.

[0095] Em várias modalidades, a presente revelação fornece, adicionalmente, um método para induzir pelo menos um neoantígeno e/ou uma resposta de célula T em um indivíduo que tem ou é suspeito de ter um distúrbio neoplástico, administrando-se ao indivíduo uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Além disso, é fornecido no presente documento, em várias modalidades, um método de tratamento de um indivíduo que tem ou suspeita ter um distúrbio neoplástico administrando-se ao indivíduo uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, induz pelo menos um neoantígeno e/ou uma resposta de célula T. Em várias modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é administrado por si só e/ou como parte de um conjugado ou composição.

[0096] Em várias outras modalidades, a presente revelação fornece um método para induzir uma resposta imunológica de RNA de fita dupla em um indivíduo que tem ou suspeita ter um distúrbio neoplástico administrando-se ao indivíduo uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Além disso, é fornecido no presente documento, em várias modalidades, um método de tratamento de um indivíduo que tem ou suspeita ter um distúrbio neoplástico administrando-se ao indivíduo uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, induz uma resposta imunológica de

RNA de fita dupla. Em várias modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é administrado por si só e/ou como parte de um conjugado ou composição.

[0097] Em ainda outras modalidades, a presente revelação fornece um método para induzir morte de célula imunogênica em um indivíduo que tem ou suspeita ter um distúrbio neoplástico administrando-se ao indivíduo uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. É fornecido adicionalmente no presente documento, em várias modalidades, um método de tratamento de um indivíduo que tem ou suspeita ter um distúrbio neoplástico administrando-se ao indivíduo uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, induz morte de célula imunogênica. Em várias modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é administrado por si só e/ou como parte de um conjugado ou composição.

[0098] Em algumas modalidades dos métodos terapêuticos descritos no presente documento, a quantidade de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, administrada é reduzida devido à indução de pelo menos um neoantígeno e/ou uma resposta de célula T, com relação a uma dosagem padrão do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, a quantidade administrada de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é reduzida em 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% ou 90%, em relação a uma dosagem padrão de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é administrado com frequência pelo menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, ou 90% menor, em relação a um regime de dosagem padrão de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, a quantidade e/ou dosagem administrada de Composto 1, ou um sal

farmaceuticamente aceitável do mesmo, resulta em toxicidade sistemática inferior e/ou tolerância melhorada.

[0099] Em algumas modalidades, os métodos descritos no presente documento podem compreender adicionalmente administrar pelo menos uma terapia adicional (por exemplo, um inibidor de ponto de verificação, uma vacina de neoantígeno, uma citocina ou análogo de citocina, CAR-T, etc.). Em algumas modalidades, a quantidade de Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional administrada é reduzida devido à indução de pelo menos um neoantígeno e/ou uma resposta de célula T, em relação a uma dosagem padrão de Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional. Em algumas modalidades, a quantidade de Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional administrada é reduzida devido à indução de uma resposta imunológica de RNA de fita dupla, em comparação com uma dosagem padrão de Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional. Em algumas modalidades, a quantidade de Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional administrada é reduzida devido à indução de morte de célula imunogênica, em comparação com uma dosagem padrão de Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional. Em algumas modalidades, a quantidade administrada de Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional é reduzida em 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, ou 90%, em relação a uma dosagem padrão de Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional. Em algumas modalidades, o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional é administrada com frequência pelo menos 10%, 15%, 20%, 25%,

30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, ou 90% menor, em relação a um regime de dosagem padrão de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional. Em algumas modalidades, a quantidade administrada e/ou dosagem de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional resulta em toxicidade sistemática inferior e/ou tolerância melhorada.

[0100] Como usado no presente documento, o termo "dosagem padrão" ou "regime de dosagem padrão" se refere a qualquer regime de dosagem normal ou rotineiro de um agente terapêutico, por exemplo, um regime proposto pelo fabricante, aprovado por autoridades reguladoras ou, de outro modo, testado em indivíduos humanos para satisfazer as necessidades do paciente normal. Em algumas modalidades, o agente terapêutico é o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0101] De maneira similar, um regime de dosagem padrão para ipilimumabe, um anticorpo de inibidor de ponto de verificação anti-CTLA4 exemplificativo, pode ser 3 mg/kg administrado por via intravenosa durante 90 minutos a cada 3 semanas para 4 doses (Yervoy® (ipilimumabe) FDA Label Supplement, 2018). Outro regime de dosagem padrão para ipilimumabe pode ser 10 mg/kg administrado por via intravenosa durante 90 minutos a cada 3 semanas para 4 doses, seguido de 10 mg/kg a cada 12 semanas por até 3 anos (Yervoy® (ipilimumabe) FDA Label Supplement, 2018).

[0102] Como outro exemplo, um regime de dosagem padrão para nivolumabe, um anticorpo de inibidor de ponto de verificação anti-PD1 exemplificativo, pode ser 3 mg/kg administrado por via intravenosa durante 60 minutos a cada 2 semanas (Opdivo® (nivolumabe) FDA Label Supplement, 2015).

[0103] Como outro exemplo, um regime de dosagem padrão para atezolizumabe, um anticorpo de inibidor de ponto de verificação anti-PDL1 exemplificativo, pode ser 1200 mg administrado por via intravenosa por 60 minutos a cada 3 semanas para 4 doses (Tecentriq® (atezolizumabe) FDA

Label Supplement, 2018).

[0104] Em algumas modalidades, a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é iniciada antes da administração da pelo menos uma terapia adicional. Em outras modalidades, a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é iniciada após a administração da pelo menos uma terapia adicional. Em ainda outras modalidades, a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é iniciada simultaneamente com a administração da pelo menos uma terapia adicional.

[0105] Em algumas modalidades, a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é repetida pelo menos uma vez após a administração inicial. Em algumas modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, usado para administração repetida é reduzido em relação à quantidade usada para administração inicial. Em algumas modalidades, a quantidade do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, usada para administração repetida é reduzida em relação a uma dosagem padrão do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, a quantidade do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, usada para administração repetida é reduzida em 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, ou 90%, em relação a uma dosagem padrão ou dosagem inicial do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0106] Em algumas modalidades, a administração da pelo menos uma terapia adicional é repetida pelo menos uma vez após a administração inicial. Em algumas modalidades, a quantidade da pelo menos uma terapia adicional usada para administração repetida é reduzida em relação à quantidade usada para a administração inicial. Em algumas modalidades, a quantidade da pelo menos uma terapia adicional usada para administração repetida é reduzida em relação a uma dosagem padrão da pelo menos uma

terapia adicional. Em algumas modalidades, a quantidade da pelo menos uma terapia adicional usada para administração repetida é reduzida em 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% ou 90%, em relação a uma dosagem padrão ou dosagem inicial da pelo menos uma terapia adicional.

[0107] Em algumas modalidades, a administração repetida do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é simultânea com a administração repetida da pelo menos uma terapia adicional. Em algumas modalidades, a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é sequencial ou escalonada com administração repetida da pelo menos uma terapia adicional.

[0108] Em algumas modalidades, a pelo menos uma terapia adicional compreende administrar um inibidor de ponto de verificação, por exemplo, qualquer inibidor de ponto de verificação revelado no presente documento. Em algumas modalidades, o indivíduo é intolerante, não responsivo ou pouco responsivo ao inibidor de ponto de verificação quando administrado sozinho. Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado em PD1/PDL1, CTLA4, OX40, CD40, LAG3, TIM3, GITR e/ou KIR. Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado em CTLA4, OX40, CD40 e/ou GITR. Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é um anticorpo que tem atividade inibitória ou agonista para seu alvo. Em algumas modalidades, um inibidor de ponto de verificação é alvejado com um anticorpo inibitório ou outra molécula inibitória similar. Em outras modalidades, um inibidor de ponto de verificação é alvejado com um anticorpo agonista ou outra molécula inibitória similar.

[0109] Em algumas outras modalidades, a pelo menos uma terapia adicional compreende administrar uma vacina de neoantígeno, por exemplo, qualquer vacina de neoantígeno revelada no presente documento. Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno. Em algumas modalidades, o pelo menos um peptídeo de neoantígeno está na faixa de cerca de 10 a cerca de 35

aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o pelo menos um peptídeo de neoantígeno está na faixa de cerca de 15 a cerca de 25 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o pelo menos um peptídeo de neoantígeno compreende uma sequência de neoantígenos conhecida. Em algumas modalidades, a sequência de neoantígenos conhecida é uma vacina de neoantígeno personalizada para o indivíduo.

[0110] O termo "personalizado" quando usado para descrever uma vacina de neoantígeno se refere a uma vacina criada identificando-se um ou mais neoantígenos produzidos em um paciente, preferencialmente como um resultado de uma exposição anterior ao Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e então com o uso de um ou mais desses neoantígenos como base da vacina para o mesmo paciente. Conseqüentemente, em algumas modalidades, um paciente recebe o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e é examinado para neoantígenos produzidos pelo tratamento. Subseqüentemente, em algumas modalidades, um ou mais desses neoantígenos são usados para criar uma vacina personalizada que é administrada ao paciente. Em algumas modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e/ou a vacina de peptídeo ou mRNA pode ser administrada ao paciente uma vez ou repetidamente.

[0111] O termo "universal", quando usado para descrever uma vacina de neoantígeno se refere a uma vacina que tem uma sequência de peptídeos ou mRNAs que é com base em neoantígeno (ou neoantígenos) comum ou conhecido observado sequenciando-se neoantígenos produzidos em múltiplos pacientes e/ou amostras de tecido de paciente, preferencialmente como um resultado de uma exposição anterior ao Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Subseqüentemente, em algumas modalidades, essa sequência de peptídeo ou de mRNA é usada para vacinar outros pacientes. Em algumas modalidades, um paciente recebe o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e então recebe uma

vacina de peptídeo ou mRNA de neoantígeno conhecido para aprimorar a resposta imunológica nos neoantígenos produzidos pelo Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e/ou a vacina de peptídeo ou mRNA pode ser administrada ao paciente uma vez ou repetidamente.

[0112] Em algumas modalidades, a sequência de neoantígenos conhecida foi identificada sequenciando-se pelo menos um peptídeo de neoantígeno, ou seu mRNA codificante, induzido no indivíduo administrando-se uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, o pelo menos um peptídeo de neoantígeno compreende uma sequência de neoantígenos modificada ou inovadora induzida colocando-se uma célula neoplásica em contato com uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, a célula neoplásica está presente em uma cultura celular in vitro. Em algumas modalidades, a célula neoplásica é obtida a partir do indivíduo. Em algumas modalidades, a célula neoplásica está presente no indivíduo.

[0113] Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno e um carreador farmacologicamente aceitável (por exemplo, qualquer um dos carreadores descritos no presente documento). Em algumas modalidades, o pelo menos um peptídeo de neoantígeno está ligado ao carreador farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, o carreador farmacologicamente aceitável é selecionado dentre um peptídeo, uma albumina sérica, uma hemocianina de lapa, uma imunoglobulina, uma tiroglobulina, uma ovalbumina, um toxoide ou um derivado de toxoide atenuado, uma citocina e uma quimiocina. Em algumas modalidades, o peptídeo de neoantígeno e o carreador farmacologicamente aceitável estão ligados covalentemente através de um ligante. Em algumas modalidades, o peptídeo de neoantígeno e o carreador farmacologicamente

aceitável são expressos como uma proteína de fusão. Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno e um diluente farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno e um adjuvante farmacologicamente aceitável.

[0114] Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno. Em algumas modalidades, o pelo menos um mRNA de neoantígeno codifica uma sequência de neoantígenos conhecida. Em algumas modalidades, a sequência de neoantígenos conhecida é uma vacina de neoantígeno personalizada para o indivíduo. Em algumas modalidades, a sequência de neoantígenos conhecida foi identificada sequenciando-se pelo menos um neoantígeno induzido no indivíduo administrando-se uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, o pelo menos um mRNA de neoantígeno codifica uma sequência de neoantígenos modificada ou inovadora induzida colocando-se uma célula neoplásica em contato com uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, a célula neoplásica está presente em uma cultura celular *in vitro*. Em algumas modalidades, a célula neoplásica é obtida a partir do indivíduo. Em algumas modalidades, a célula neoplásica está presente no indivíduo.

[0115] Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno e um carreador farmacologicamente aceitável (por exemplo, qualquer um dos carreadores exemplificativos descritos no presente documento). Em algumas modalidades, o pelo menos um mRNA de neoantígeno está ligado ao carreador farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, o carreador farmacologicamente aceitável é escolhido dentre um peptídeo, uma albumina sérica, uma hemocianina de lapa, uma imunoglobulina, uma tiroglobulina, uma ovalbumina, um toxoide ou um derivado de toxoide atenuado, uma citocina e

uma quimiocina. Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno e um diluente farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno e um adjuvante farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, o mRNA de neoantígeno é encapsulado por um agente de encapsulação. Em algumas modalidades, o agente de encapsulação é um lipossoma. Em algumas modalidades, o agente de encapsulação é uma nanopartícula.

[0116] Em algumas modalidades, a pelo menos uma terapia adicional compreende administrar uma citocina ou análogo de citocina, por exemplo, qualquer citocina ou análogo de citocina revelado no presente documento. Em algumas modalidades, o indivíduo é intolerante, não responsivo ou pouco responsivo à citocina ou análogo de citocina quando administrado sozinho. Em algumas modalidades, a citocina ou análogo de citocina compreende um intensificador de célula T. Em algumas modalidades, a citocina ou análogo de citocina compreende IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IFN γ e/ou TNF α . Em algumas modalidades, a citocina ou análogo de citocina compreende IL-2, IL-10, IL-12 e/ou IL-15. Em algumas modalidades, a administração da citocina ou análogo de citocina aprimora a iniciação de célula T depois da administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, devido à indução e apresentação de neoantígenos.

[0117] Em algumas modalidades, a pelo menos uma terapia adicional compreende administrar células T de alvejamento de tumor manipuladas (ou seja, CAR-T), por exemplo, qualquer terapia com CAR-T revelada no presente documento.

[0118] Em algumas modalidades, os métodos descritos no presente documento podem compreender adicionalmente detectar um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T no indivíduo após a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e, opcionalmente, continuar a administração do Composto 1, ou um sal

farmaceuticamente aceitável do mesmo, se um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T for detectada. Em algumas modalidades, a detecção de um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T no indivíduo indica eficácia de tratamento com o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, o tratamento com a terapia adicional, juntamente com o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, é continuado se um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T for detectada. Em algumas modalidades, o tratamento é continuado em uma dosagem e/ou frequência reduzida se um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T forem detectados.

[0119] Em algumas modalidades, os métodos descritos no presente documento podem compreender adicionalmente detectar uma resposta imunológica de RNA de fita dupla no indivíduo após a administração do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e, opcionalmente, continuar a administração do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, se uma resposta imunológica de RNA de fita dupla for detectada. Em algumas modalidades, a detecção de uma resposta imunológica de RNA de fita dupla no indivíduo indica a eficácia de tratamento com o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, o tratamento com a terapia adicional, juntamente com o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, é continuado se uma resposta imunológica de RNA de fita dupla for detectada. Em algumas modalidades, o tratamento é continuado em uma dosagem e/ou frequência reduzida se uma resposta imunológica de RNA dupla fita for detectada.

[0120] Em algumas modalidades, os métodos descritos no presente documento podem compreender adicionalmente detectar morte de célula imunogênica no indivíduo após a administração do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e, opcionalmente, continuar a administração do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do

mesmo, se a morte de célula imunogênica for detectada. Em algumas modalidades, a detecção de morte de célula imunogênica no indivíduo indica a eficácia de tratamento com o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, o tratamento com a terapia adicional, juntamente com o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é continuado se a morte de célula imunogênica for detectada. Em algumas modalidades, o tratamento é continuado em uma dosagem e/ou frequência reduzida se morte celular imunogênica for detectada.

[0121] Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 150 mutações ou menos. Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 100 mutações ou menos. Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 50 mutações ou menos. Em algumas modalidades, o indivíduo tem ou se suspeita que tenha um distúrbio neoplásico, por exemplo, uma malignidade hematológica ou um tumor sólido. Em algumas modalidades, a malignidade hematológica é selecionada dentre uma malignidade de célula B, uma leucemia, um linfoma e um mieloma. Em algumas modalidades, a malignidade hematológica é selecionada dentre leucemia mieloide aguda e mieloma múltiplo. Em algumas modalidades, o tumor sólido é selecionado dentre câncer de mama, câncer gástrico, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer uterino, carcinoma do duto salivar, melanoma, câncer de cólon e câncer de esôfago. Em algumas modalidades, o tumor sólido é selecionado dentre câncer de mama positivo para HER2, adenocarcinoma gástrico e câncer de próstata.

[0122] Em várias modalidades, a presente revelação fornece adicionalmente um método de tratamento de um indivíduo que tem ou que se suspeita que tenha um distúrbio neoplásico, que compreende: (a) administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, induz pelo menos um

neoantígeno e/ou uma resposta de célula T; (b) detectar um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T no indivíduo após a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo; e (c) continuar a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, se um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T for detectada. Em algumas modalidades, a detecção de um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T no indivíduo indica eficácia de tratamento com o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em várias modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é administrado por si só e/ou como parte de um conjugado ou composição.

Combinação de Composto 1 e Inibição de Ponto de Verificação Imunológico:

[0123] Em várias modalidades, um paciente que tem um câncer conforme descrito no presente documento pode ser tratado com uma combinação do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e uma terapia de inibidor de ponto de verificação. Os pontos de verificação imunológicos são vias inibitórias que retardam ou interrompem as reações imunológicas e evitam danos excessivos aos tecidos causados por atividade descontrolada de células imunológicas. Como usado no presente documento, o termo "inibidor de ponto de verificação" se destina a se referir a qualquer agente terapêutico, incluindo qualquer composto químico de molécula pequena, anticorpo, molécula de ácido nucleico ou polipeptídeo, ou quaisquer fragmentos dos mesmos, que iniba uma ou mais vias inibitórias, permitindo assim uma atividade imunológica mais extensa.

[0124] O tratamento de pacientes com inibição de ponto de verificação imunológico revelou ter eficácia robusta em determinadas indicações clínicas. Recentemente, a FDA aprovou o uso de um inibidor de ponto de verificação em pacientes com tumores que exibem alta instabilidade de microssatélites, agnósticos à linhagem de tecido. Essa aprovação foi com

base, em parte, na observação que as taxas de resposta se correlacionam positivamente com a carga mutacional (Rizvi et al. (2015) *Science* 348(6230):124-8; Hellmann et al. (2018) *Cancer Cell* 33(5):853-861). As estimativas da literatura variam em números absolutos e por linhagem, porém geralmente suportam que acima de um limiar de ~ 150 a 250 mutações, a probabilidade de resposta aumenta. A análise dos dados TCGA mostra que uma grande porcentagem de linhagens de tumor de início adulto tem carga mutacional não sinônima comparativamente baixa (Vogelstein et al. (2013) *Science* 339:1549-58). A maioria das linhagens tem taxas de mutação não sinônimas médias de ~ 30 a 80 por paciente, bem abaixo dos limiares para melhores chances de resposta aos inibidores de ponto de verificação.

[0125] Por exemplo, o câncer de mama positivo para HER2 demonstrou ter uma mediana de ~ 60 mutações não sinônimas presentes por amostra de paciente. Entretanto, estima-se que o limiar de eficácia de tratamento com inibidor de ponto de verificação, como mencionado acima, esteja na faixa de ~150 a 250 mutações não sinônimas, ou seja, pacientes acima desse limiar têm maior probabilidade de apresentar remissão completa, remissão parcial e/ou doença estável, enquanto os pacientes abaixo desse limiar têm maior probabilidade de apresentar doença progressiva. Estratégias para aumentar o número aparente de mutações não sinônimas e/ou neoantígenos que são apresentados em células tumorais são, portanto, desejáveis e podem aumentar a probabilidade de resposta total, por exemplo, a terapias com inibidor de ponto de verificação. Como as citocinas (e seus análogos) atuam através de um mecanismo de ação similar, tais estratégias podem também aumentar a probabilidade de resposta total a terapias à base de citocinas.

[0126] As taxas de resposta atuais em câncer de mama positivo para HER2 são ~15 a 25% (CTI NCT02129556). Em várias modalidades reveladas no presente documento, o tratamento com o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em combinação com um inibidor de

ponto de verificação e/ou terapia de citocina pode melhorar tais taxas de resposta. Em várias modalidades, o tratamento com o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em combinação com um inibidor de ponto de verificação e/ou terapia de citocina pode se aplicar a qualquer tumor de início adulto, particularmente aqueles nos quais a taxa mutacional não sinônima mediana está abaixo do limiar de ~150 mutações estimado. Em várias modalidades, os tipos de câncer exemplificativos adequados para o tratamento com Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, sozinho ou em combinação com uma terapia adicional (por exemplo, uma terapia com inibidor de ponto de verificação, uma terapia com citocinas) incluem, porém sem limitação, câncer esofágico, linfoma não-Hodgkin, câncer colorretal, câncer de cabeça e pescoço, câncer gástrico, câncer endometrial, adenocarcinoma pancreático, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer hepatocelular, glioblastoma, câncer de mama (por exemplo, câncer de mama HER2-positivo), câncer de pulmão (por exemplo, câncer de pulmão de células não pequenas), leucemia linfocítica crônica e leucemia mieloide aguda. Outros tipos de câncer adequados exemplificativos são identificados, por exemplo, em Vogelstein et al. (2013) Science 339:1549-58, que está incorporado no presente documento a título de referência.

[0127] Visto que muitas terapias com inibidor de ponto de verificação são com base na expressão crônica de antígenos associados a tumor, reforços regulares de tratamento são necessários para a eficácia e para "reforçar novamente" populações de células T reativas. A natureza induzível do Composto 1, ou sal farmacologicamente aceitável do mesmo, neoantígenos derivados descritos no presente documento, fornece regimes de dosagem terapêutica que podem ser projetadas para aprimorar a resposta imunológica de células T reativas ao neoantígeno, enquanto limitam a exaustão de célula T frequentemente causada pelo estímulo de antígeno crônico. Por exemplo, em algumas modalidades, uma dose inicial do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é administrada a um indivíduo para

disparar o splicing aberrante e a produção de peptídeos de neoantígeno. Após um período de tempo para permitir a produção de proteína e apresentação de antígeno, em algumas modalidades, o indivíduo é, então, administrado com uma dose inicial de um inibidor de ponto de verificação para reforçar e/ou aumentar a iniciação e expansão de células T efectoras. Em algumas modalidades, o período de espera entre as doses do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e inibidor de ponto de verificação é de cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, ou cerca de 7 dias. Em algumas modalidades, o período de espera é de entre cerca de 3 dias e cerca de 5 dias. Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado em CTLA4, OX40, CD40 e/ou GITR. Em algumas modalidades, o benefício de combinação terapêutica do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e um inibidor de ponto de verificação pode ser aditivo ou superaditivo.

[0128] Em algumas modalidades, após um período para permitir a iniciação e expansão de célula T, o indivíduo recebe, então, uma segunda dose ou dose subsequente do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, para disparar a reapresentação de peptídeos de neoantígeno. Em algumas modalidades, o período de espera entre uma dose inicial de um inibidor de ponto de verificação e uma segunda dose ou dose subsequente do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é de cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, ou cerca de 5 semanas. Em algumas modalidades, o período de espera é de cerca de 3 semanas. Depois de uma segunda dose ou dose subsequente do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em algumas modalidades, o sistema imunológico pode interagir com as células tumorais que apresentam neoantígeno e/ou elicitar a eliminação de célula tumoral. Em algumas modalidades, o indivíduo é, então, administrado com uma segunda dose ou dose subsequente do inibidor de ponto de verificação para expandir ainda mais a população de células T efectoras de memória, após permitir a iniciação e expansão de células T secundárias.

[0129] Em algumas modalidades, a dosagem do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, depois desse regime de tratamento inicial exemplificativo pode ser pulsátil, isto é, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, pode ser dosado em intervalos prolongados (por exemplo, aproximadamente a cada 4 semanas, aproximadamente a cada 5 semanas, aproximadamente a cada 6 semanas) para permitir a apresentação de antígeno, interação de célula T e/ou eliminação de célula tumoral, e/ou recuperação da população de células T de memória. Em pontos no tempo posteriores, em algumas modalidades, o tratamento de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, pode ser combinado com um ou mais inibidores de ponto de verificação alvo para restaurar funcionalidade efetora em populações de células T esgotadas. Por exemplo, em algumas modalidades, em pontos de tempo posteriores, o tratamento de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, pode ser combinado com um ou mais inibidores de ponto de verificação alvo em PD1/PDL1, LAG3 e/ou TIM3. Em algumas modalidades, a natureza pulsada da apresentação e iniciação de neoantígeno pode permitir que um inibidor de ponto de verificação e/ou o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, seja administrado com menos frequência e/ou em doses inferiores. Em algumas modalidades, a natureza pulsada da apresentação de neoantígeno pode fornecer um ou mais benefícios de tratamento para um inibidor de ponto de verificação (por exemplo, um anticorpo anti-CTLA4 como ipilimumabe), em relação ao inibidor de ponto de verificação quando administrado sem tratamento de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, simultâneo, por exemplo, reduzindo o risco potencial de reações adversas frequentemente observadas com o regime de dosagem padrão do inibidor de ponto de verificação.

[0130] Em certas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é um inibidor da trajetória de antígeno associado a linfócito T citotóxico (CTLA4). CTLA4, também conhecido como CD152, é um receptor de proteína

que regula descendentemente as respostas imunológicas. CTLA4 é constitutivamente expresso em células T reguladoras, porém apenas regulado ascendentemente em células T convencionais após a ativação. Como usado no presente documento, o termo "inibidor de CTLA4" pretende se referir a qualquer inibidor de CTLA4 e/ou da via CTLA4. Inibidores de CTLA4 exemplificativos incluem, porém sem limitação, anticorpos anti-CTLA4. Os anticorpos de bloqueio de CTLA4 para uso em seres humanos foram desenvolvidos com base na atividade pré-clínica observada em modelos de camundongo de imunidade antitumoral. Os anticorpos anti-CTLA4 exemplificativos incluem, porém sem limitação, ipilimumabe (MDX-010) e tremelimumabe (CP-675,206), ambos os quais são completamente humanos. Ipilimumabe é uma IgG1 com uma meia-vida de plasma de aproximadamente 12 a 14 dias; tremelimumabe é uma IgG2 com uma meia-vida de plasma de aproximadamente 22 dias. *Consultar, por exemplo*, Phan et al. (2003) Proc Natl Acad Sci E.U.A. 100:8,372 a 8,377; Ribas et al. (2005) J Clin Oncol. 23:8,968 a 8,977; Weber et al. (2008) J Clin Oncol. 26:5,950 a 5,956. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CTLA4 é ipilimumabe.

[0131] Em certas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é um inibidor da trajetória de morte programada-1 (PD1). A trajetória de morte celular 1 (PD1) representa um importante *switch* de controle imunológico que pode ser ativado por células tumorais para superar a vigilância imunológica de células T ativas. Os ligantes de PD1 (PDL1 e PDL2) são constitutivamente expressos ou podem ser induzidos em vários tumores. Verificou-se que a alta expressão de PDL1 em células tumorais (e em menor extensão de PDL2) se correlaciona com mau prognóstico e sobrevivência em vários outros tipos de tumor sólido. Além disso, foi sugerido que PD1 regula a expansão de células T tumor-específicas em pacientes com melanoma maligno. Essas observações sugerem que a via PD1/PDL1 exerce uma função crítica na evasão imune de tumor e pode ser considerada um alvo atraente para intervenção terapêutica. Como usado no presente documento, o termo

"inibidor de PD1" pretende se referir a qualquer inibidor de PD1 e/ou da via PD1. Inibidores de PD1 exemplificativos incluem, porém sem limitação, anticorpos anti-PD1 e anti-PDL1. Em certas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é um anticorpo anti-PD1. Anticorpos anti-PD1 exemplificativos incluem, porém sem limitação, nivolumabe e pembrolizumabe (MK-3475). Nivolumabe, por exemplo, é um anticorpo de inibidor de ponto de verificação imunológico PD1 de imunoglobulina completamente humana G4 (IgG4) que interrompe a interação do receptor de PD1 com seus ligantes PDL1 e PDL2, inibindo assim a resposta imunológica celular (Guo et al.(2017) J Cancer 8(3):410 a 416). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD1 é nivolumabe. Pembrolizumabe, por exemplo, é um mAb humanizado potente e altamente seletivo do isótipo IgG4 /kappa projetado para bloquear diretamente a interação entre PD1 e seus ligantes, PDL1 e PDL2. Pembrolizumabe aumenta fortemente as respostas imunológicas de linfócitos T em células sanguíneas cultivadas de doadores humanos saudáveis, pacientes com câncer e primatas. Também foi relatado que pembrolizumabe modula o nível de interleucina-2 (IL-2), fator alfa de necrose tumoral (TNF α), interferon gama (IFN γ) e outras citocinas. Os anticorpos anti-PDL1 exemplificativos incluem, porém sem limitação atezolizumabe, avelumabe e durvalumabe. Atezolizumabe, por exemplo, é um mAb humanizado com IgG1 que é relatado para bloquear a interação de PD1/PDL1, alvejando o PDL1 expresso em vários tipos de células malignas. O bloqueio da via de PD1/PDL1 pode estimular os mecanismos de defesa imunológica contra tumores (Abdin et al. (2018) Cancers (Basel) 10(2):32). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PDL1 é atezolizumabe.

[0132] Em certas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado em PD1/PDL1, CTLA4, OX40, CD40, LAG3, TIM3, GITR e/ou KIR. Em certas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado em CTLA4, OX40, CD40 e/ou GITR. Em certas modalidades, um inibidor de ponto de verificação é alvejado com um anticorpo inibitório ou outra molécula inibitória similar (por exemplo, um anticorpo inibitório anti-CTLA4 ou anti-

PD1/PDL1). Em certas outras modalidades, um inibidor de ponto de verificação é alvejado com um agonista para o alvo; exemplos dessa classe incluem os alvos estimulatórios OX40, CD40 e/ou GITR. Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de verificação alvejado em OX40, CD40, e/ou GITR é um anticorpo agonista. Os anticorpos agonistas dirigidos contra OX40 podem ter uma função dupla, inibindo a supressão de células T regulatórias, enquanto aumentam as funções de células T efetoras. Os anticorpos agonistas anti-GITR também revelaram tornar as células T efetoras mais resistentes à inibição induzida por células T reguladoras (Karakaki et al. (2016) *Vaccines (Basel)* 4(4):37). De modo semelhante, os anticorpos CD40 agonistas demonstram atividade antitumoral dependente de célula T. A ativação de CD40 em células dendríticas aumentar a apresentação cruzada de antígenos tumorais e conseqüentemente o número de células T efetoras dirigidas contra tumor (Ellmark et al. (2015) *Oncoimmunol.* 4(7):e1011484).

[0133] Em certas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado em CTLA4 (por exemplo, um anticorpo anti-CTLA4). Em certas modalidades, o alvejamento de CTLA4 facilita a iniciação e a ativação de células T virgens. Em certas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado em OX40 (por exemplo, um anticorpo anti-OX40). Em certas modalidades, o alvejamento de OX40 aumenta a expansão de células T efetoras. Em certas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado em CD40 (por exemplo, um anticorpo anti-CD40). Em certas modalidades, o alvejamento de CD40 inibe a iniciação "tolerogênica" de células T e/ou a formação de células T reguladoras. Em certas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado em GITR (por exemplo, um anticorpo anti-GITR). Em certas modalidades, o alvejamento de GITR inibe a atividade de células T reguladoras. Em certas modalidades, o benefício da terapia de combinação (por exemplo, o efeito sobre pelo menos um sintoma ou o risco/taxa de progressão da doença) com o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e um agente alvejado por CTLA4, OX40, CD40, e/ou

GITR é aditivo. Em algumas modalidades, o benefício da terapia de combinação com o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e um agente alvejado por CTLA4, OX40, CD40 e/ou GITR é superaditivo (isto é, sinérgico).

[0134] As estratégias de tratamento com inibidores de ponto de verificação são com base na hipótese de que o tratamento facilita e/ou aumenta a iniciação de respostas de células T a tumores pouco ou fracamente antigênicos (por exemplo, CTLA4) ou de que o tratamento restaura e/ou revigora as células T que respondem aos antígenos tumorais, porém se tornaram "esgotados" devido à natureza crônica da apresentação de antígenos (por exemplo, PD1, PDL1) (Chen e Mellman (2013) *Immunity* 39(1):1 a 10). Exemplos de terapias e agentes com inibição de ponto de verificação adequados, por exemplo, anticorpos anti-PD1, anti-PDL1 ou anti-CTLA4, são conhecidos na técnica. *Consultar, por exemplo,* o documento n° WO 2001/014424, o documento n° WO 2013/173223, o documento n° WO 2016/007235.

[0135] A combinação dessas respostas de célula T iniciadas depois da terapia de inibidor de ponto de verificação com o tratamento para induzir neoantígenos em células tumorais (por exemplo, através da administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo) ao qual o sistema imunológico iniciado pode reagir pode fornecer sinergia benéfica. Como os neoantígenos derivados de Composto 1, ou sal farmacologicamente aceitável do mesmo, não foram ainda apresentados para iniciação de célula T, a combinação com um inibidor de CTLA4 pode ser particularmente benéfica. Em algumas modalidades, o tratamento compreende administrar o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, para induzir a produção de neoantígenos, seguida antes, simultaneamente ou depois por uma administração inicial de um inibidor de CTLA4 para estimular a iniciação de célula T CD8. Em algumas modalidades, administrações adicionais de um inibidor de CTLA4 são fornecidas ao paciente, por exemplo, para

estimular ainda mais a iniciação e/ou ativação de populações de CD8 reativas a neoantígeno. Em algumas modalidades, administrações adicionais do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, podem ser dadas ao paciente para aumentar a apresentação de neoantígeno pelo tumor. Administrações de repetição do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e terapia de inibidor de ponto de verificação podem ocorrer simultaneamente ou em intervalos escalonados. Em algumas modalidades, o tratamento compreende adicionalmente administrar um cotratamento com inibidor de PD1/ PDL1, por exemplo, para restaurar a função efetora de células T alvejadas em neoantígeno esgotado dentro do microambiente de tumor.

[0136] Os termos "combinação" ou "terapia de combinação," conforme usados no presente documento, se referem à administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, juntamente com um agente ou terapia adicional (por exemplo, um inibidor de ponto de verificação, uma citocina ou análogo de citocina, uma vacina de neoantígeno, CAR-T), como parte de um regime de tratamento destinado a fornecer um efeito benéfico (isto é, aditivo ou sinérgico) a partir da ação conjunta de um ou mais dos agentes administrados. Em algumas modalidades, a combinação pode também incluir um ou mais agentes adicionais, incluindo, porém sem limitação, agentes quimioterápicos, agentes antiangiogênese, e agentes que reduzem a imunossupressão (por exemplo, um segundo inibidor de ponto de verificação). O efeito benéfico da combinação inclui, porém sem limitação, ação conjunta farmacocinética ou farmacodinâmica resultante da combinação de agentes terapêuticos. A administração desses agentes terapêuticos em combinação é tipicamente realizada durante um período de tempo definido (por exemplo, minutos, horas, dias ou semanas dependendo da combinação selecionada).

[0137] Administrado "em combinação" ou "coadministração," como usado no presente documento, significa que dois ou mais tratamentos

diferentes são administrados a um indivíduo durante a aflição do indivíduo com uma afecção médica (por exemplo, um distúrbio neoplásico). Por exemplo, em algumas modalidades, os dois ou mais tratamentos são administrados após o indivíduo ser diagnosticado com uma doença ou distúrbio, e antes de a doença ou distúrbio ser curado ou eliminado, ou quando um indivíduo é identificado como estando em risco, porém antes de o indivíduo desenvolver sintomas da doença. Em algumas modalidades, a administração de um tratamento ainda está ocorrendo quando a administração do segundo tratamento começa, de modo que haja sobreposição. Em algumas modalidades, o primeiro e o segundo tratamentos são iniciados ao mesmo tempo. Esses tipos de administração são, às vezes, chamados no presente documento de administração "simultânea", "conjunta" ou "concomitante". Em outras modalidades, a administração de um tratamento termina antes de a administração do segundo tratamento começar. Este tipo de administração é, às vezes, chamada no presente documento de administração "sucessiva" ou "sequencial".

[0138] Em algumas modalidades, os dois tratamentos (por exemplo, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e um inibidor de ponto de verificação) são compreendidos na mesma composição. Tais composições podem ser administradas de qualquer forma adequada e por qualquer via adequada. Em outras modalidades, os dois tratamentos (por exemplo, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e um inibidor de ponto de verificação) são administrados em composições separadas, em qualquer forma apropriada e através de qualquer rota adequada. Por exemplo, em algumas modalidades, uma composição que compreende o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e uma composição que compreende um inibidor de ponto de verificação pode ser administrada simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem em diferentes pontos no tempo; em todo caso, devem ser administradas suficientemente próximas em tempo de modo a fornecer o efeito

terapêutico ou profilático desejado.

[0139] Em modalidades de administração simultânea ou sequencial, o tratamento pode ser mais eficaz devido à administração combinada. Em algumas modalidades, o primeiro tratamento é mais eficaz, por exemplo, um efeito equivalente é observado com menos do primeiro tratamento (por exemplo, com uma dose mais baixa), do que poderia ser observado se o primeiro tratamento fosse administrado na ausência do segundo tratamento. Em algumas modalidades, o primeiro tratamento é mais eficaz de modo que a redução em um sintoma, ou outro parâmetro associado à doença ou distúrbio, seja maior do que poderia ser observado com o primeiro tratamento administrado na ausência do segundo tratamento. Em outras modalidades, uma situação análoga é observada com o segundo tratamento. Em algumas modalidades, o benefício de terapia de combinação (por exemplo, o efeito sobre pelo menos um sintoma ou o risco/taxa de progressão da doença) é aditivo. Em algumas modalidades, o benefício de terapia de combinação é superaditivo.

[0140] Em várias modalidades, a presente revelação fornece um método de tratamento de um indivíduo que tem ou suspeita ter um distúrbio neoplástico administrando-se ao indivíduo uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo; e pelo menos uma terapia adicional (por exemplo, uma terapia de inibidor de ponto de verificação, uma citocina ou análogo de citocina, uma vacina de neoantígeno, CAR-T). Em algumas modalidades, a administração de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, induz pelo menos um neoantígeno e/ou uma resposta de célula T. Em algumas modalidades, a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, induz uma resposta imunológica de RNA de fita dupla. Em algumas modalidades, a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, induz a morte de célula imunogênica. Em algumas modalidades, a pelo menos uma terapia adicional pode compreender pelo menos uma, pelo

menos duas, pelo menos três, pelo menos quatro ou pelo menos cinco terapias adicionais. Por exemplo, em algumas modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, pode ser administrado em combinação com duas terapias de ponto de verificação, isto é, com o uso de dois diferentes inibidores de ponto de verificação. Em algumas outras modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, pode ser administrado em combinação com uma terapia de inibidor de ponto de verificação e uma vacina de neoantígeno. Em algumas modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, pode ser administrado por si só e/ou como parte de um conjugado ou composição.

[0141] Em algumas modalidades da terapia de combinação, a quantidade administrada de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional é reduzida em 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, ou 90%, em relação a uma dosagem padrão de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional. Em algumas modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional é administrada com frequência pelo menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, ou 90% menor, em relação a um regime de dosagem padrão de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional. Em algumas modalidades, a quantidade administrada e/ou dosagem de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional resulta em toxicidade sistemática inferior e/ou tolerância melhorada.

[0142] Em algumas modalidades, a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é iniciada antes da administração da pelo menos uma terapia adicional. Em algumas modalidades, a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é iniciada após a administração da pelo menos uma terapia adicional.

Em algumas modalidades, a administração do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, é iniciada simultaneamente com a administração da pelo menos uma terapia adicional.

[0143] Em algumas modalidades, a administração do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, é repetida pelo menos uma vez após a administração inicial. Em algumas modalidades, a quantidade do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, usada para administração repetida é reduzida em relação à quantidade usada para administração inicial. Em algumas modalidades, a quantidade do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, usada para administração repetida é reduzida em relação a uma dosagem padrão do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, a quantidade do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, usada para administração repetida é reduzida em 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, ou 90%, em relação a uma dosagem padrão do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[0144] Em algumas modalidades, a administração da pelo menos uma terapia adicional é repetida pelo menos uma vez após a administração inicial. Em algumas modalidades, a quantidade da pelo menos uma terapia adicional usada para administração repetida é reduzida em relação à quantidade usada para a administração inicial. Em algumas modalidades, a quantidade da pelo menos uma terapia adicional usada para administração repetida é reduzida em relação a uma dosagem padrão da pelo menos uma terapia adicional. Em algumas modalidades, a quantidade da pelo menos uma terapia adicional usada para administração repetida é reduzida em 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% ou 90%, em relação a uma dosagem padrão da pelo menos uma terapia adicional.

[0145] Em algumas modalidades, a administração repetida do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, é simultânea com a administração repetida da pelo menos uma terapia adicional. Em

algumas modalidades, a administração repetida do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é sequencial ou escalonada com administração repetida da pelo menos uma terapia adicional.

[0146] Em várias modalidades, a presente revelação fornece um método de tratamento de um indivíduo que tem ou suspeita ter um distúrbio neoplásico administrando-se ao indivíduo uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo; e uma terapia de inibidor de ponto de verificação. Em algumas modalidades, a terapia com inibidor de ponto de verificação compreende administrar pelo menos um inibidor de ponto de verificação. Em algumas modalidades, o indivíduo é intolerante, não responsivo ou pouco responsivo ao pelo menos um inibidor de ponto de verificação quando administrado sozinho. Em algumas modalidades, um indivíduo pode ser considerado não-responsivo ou pouco responsivo ao pelo menos um inibidor de ponto de verificação como determinado com o uso, por exemplo, dos Critérios de Resposta imunorrelacionados (irRC) e/ou dos Critérios de Avaliação de Resposta imunorrelacionados em Tumores Sólidos (irRECIST). *Consultar, por exemplo, Wolchok et al. (2009) Clin Cancer Res. 15(23):7,412 a 7,420; Bohnsack et al. "Adaptation of the Immune-Related Response Criteria:irRECIST" (Resumo 4,958) ESMO 2014.* Critérios exemplificativos podem incluir aqueles usados na técnica para definir quando os tumores em pacientes com câncer melhoram ("respondem"), permanecem os mesmos ("estabilizam") ou pioram ("progridem") durante o tratamento, quando o tratamento que está sendo avaliado é um fármaco imuno-oncológico (por exemplo, um inibidor de ponto de verificação). Em algumas modalidades, um indivíduo pode ser considerado intolerante ao pelo menos um inibidor de ponto de verificação se o indivíduo apresentar um ou mais eventos adversos (grau 2+) identificados para o respectivo inibidor de ponto de verificação (por exemplo, ipilimumabe). Em algumas modalidades, por exemplo, um indivíduo pode ser considerado intolerante ao tratamento com ipilimumabe se o indivíduo apresentar um ou mais eventos adversos selecionados dentre enterocolite,

hepatite, dermatite (incluindo necrólise epidérmica tóxica), neuropatia e endocrinopatia (Yervoy® (ipilimumab) FDA Label Supplement, 2018). Em algumas modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, pode ser administrado por si só e/ou como parte de um conjugado ou composição.

[0147] Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado em PD1/PDL1, CTLA4, OX40, CD40, LAG3, TIM3, GITR e/ou KIR. Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado em CTLA4, OX40, CD40 e/ou GITR. Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado com um anticorpo inibitório ou outra molécula inibitória similar. Em algumas outras modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado com um anticorpo agonista ou outra molécula inibitória similar. Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de verificação compreende um inibidor de trajetória de antígeno associado a linfócito T citotóxico 4 (CTLA4). Em algumas modalidades, o inibidor de CTLA4 é um anticorpo anti-CTLA4. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CTLA4 é ipilimumabe. Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de verificação compreende um inibidor de trajetória de morte programada 1 (PD1). Em algumas modalidades, o inibidor de PD1 é um anticorpo anti-PD1. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD1 é nivolumabe. Em algumas modalidades, o inibidor de PD1 é um anticorpo anti-PDL1. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PDL1 é atezolizumabe. Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de verificação compreende um inibidor de CTLA4 e um inibidor de PD1. Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado em OX40. Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado em CD40. Em algumas modalidades, o inibidor de ponto de verificação é alvejado em GITR. Em algumas modalidades, o benefício da terapia de combinação (por exemplo, o efeito sobre pelo menos um sintoma ou o risco/taxa de progressão de doença) com o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e um inibidor de ponto de verificação

(por exemplo, um anticorpo ou molécula alvejada por CTLA4, PD1/PDL1, OX40, CD40 e/ou GITR) é aditivo. Em algumas modalidades, o benefício da terapia de combinação com o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e um inibidor de ponto de verificação (por exemplo, um anticorpo ou molécula alvejada por CTLA4, PD1/PDL1, OX40, CD40 e/ou GITR) é superaditivo (isto é, sinérgico).

[0148] Em várias modalidades, a presente revelação fornece um método de tratamento de um indivíduo que tem ou suspeita ter um distúrbio neoplásico administrando-se ao indivíduo uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo; e uma terapia de citocina ou análogo de citocina. Em algumas modalidades, a terapia com citocina ou análogo de citocina compreende administrar pelo menos uma citocina ou análogo de citocina. Em algumas modalidades, o indivíduo é intolerante, não responsivo ou pouco responsivo à pelo menos uma citocina ou análogo de citocina quando administrado sozinho. Em algumas modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é administrado por si só e/ou como parte de um conjugado ou composição.

[0149] Em algumas modalidades, a citocina ou análogo de citocina compreende um intensificador de célula T. Em algumas modalidades, a citocina ou análogo de citocina compreende IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IFN γ e/ou TNF α . Em algumas modalidades, a citocina ou análogo de citocina compreende IL-2, IL-10, IL-12 e/ou IL-15. Em algumas modalidades, a administração da citocina ou análogo de citocina aprimora a iniciação de célula T depois da administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, devido à indução e apresentação de neoantígenos.

[0150] Em algumas modalidades, a citocina ou análogo de citocina compreende IL-2. Em algumas modalidades, IL-2 reforça os sinais para as células efetoras promovendo sua expansão (Rosenberg (2014) J Immunol. 192(12):5451-8). Em algumas modalidades, a citocina ou análogo de citocina compreende IL-10. Em algumas modalidades, IL-10 reforça a iniciação e a

ativação de célula T CD8+ (Mumm et al. (2011) Cancer Cell 20(6):781-96). Em algumas modalidades, a citocina ou análogo de citocina compreende IL-12. Em algumas modalidades, IL-12 liga as respostas imunológicas inatas e adaptativas para reforçar a iniciação e o alvejamento antígeno-específico (Tugues et al. (2015) Cell Death Differ. 22(2):237 a 246). Em algumas modalidades, a citocina ou análogo de citocina compreende IL-15. Em algumas modalidades, IL-15 reforça a iniciação e/ou ativação de célula T-efetora (CD8). Em algumas modalidades, a citocina ou análogo de citocina compreende IFN γ . Em algumas modalidades, IFN γ suplementa a secreção de célula T-efetora de IFN γ . Em algumas modalidades, a citocina ou análogo de citocina compreende TNF α . Em algumas modalidades, TNF α suplementa a secreção de célula T-efetora de TNF α .

[0151] Em algumas modalidades, uma dose inicial do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é administrada a um indivíduo para disparar o splicing aberrante e a produção de peptídeos de neoantígeno. Após um período de tempo para permitir a produção de proteína e apresentação de antígeno, em algumas modalidades, o indivíduo é, então, administrado com uma dose inicial de uma citocina ou análogo de citocina para reforçar e/ou aumentar a iniciação e expansão de células T efetoras. Em algumas modalidades, o período de espera entre as doses do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e citocina ou análogo de citocina é de cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, ou cerca de 7 dias. Em algumas modalidades, o período de espera é de entre cerca de 3 dias e cerca de 5 dias. Em algumas modalidades, a citocina ou análogo de citocina é IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IFN γ e/ou TNF α . Em algumas modalidades, o benefício de combinação terapêutica do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e uma citocina ou análogo de citocina pode ser aditivo ou superaditivo.

[0152] Em algumas modalidades, após um período para permitir a iniciação e expansão de célula T, o indivíduo recebe, então, uma segunda dose

ou dose subsequente do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, para disparar a reapresentação de peptídeos de neoantígeno. Em algumas modalidades, o período de espera entre uma dose inicial de uma citocina ou análogo de citocina e uma segunda dose ou dose subsequente do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é de cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, ou cerca de 5 semanas. Em algumas modalidades, o período de espera é de cerca de 3 semanas. Em algumas modalidades, doses subsequentes da citocina ou análogo de citocina podem ser administradas, por exemplo, intercaladas entre doses subsequentes do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Depois de uma segunda dose ou dose subsequente do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em algumas modalidades, o sistema imunológico pode interagir com as células tumorais que apresentam neoantígeno e/ou elicitar a eliminação de célula tumoral. Em algumas modalidades, a dosagem do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, depois desse regime de tratamento inicial exemplificativo pode ser pulsátil, isto é, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, pode ser dosado em intervalos prolongados (por exemplo, aproximadamente a cada 4 semanas, aproximadamente a cada 5 semanas, aproximadamente a cada 6 semanas) para permitir a apresentação de antígeno, interação de célula T e/ou eliminação de célula tumoral, e/ou recuperação da população de células T de memória.

[0153] Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 150 mutações ou menos. Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 100 mutações ou menos. Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 50 mutações ou menos. Em algumas modalidades, o indivíduo tem ou se suspeita que tenha um distúrbio neoplásico, por exemplo, uma malignidade hematológica ou um tumor sólido. Em algumas modalidades, a malignidade hematológica é selecionada dentre

uma malignidade de célula B, uma leucemia, um linfoma e um mieloma. Em algumas modalidades, a malignidade hematológica é selecionada dentre leucemia mieloide aguda e mieloma múltiplo. Em algumas modalidades, o tumor sólido é selecionado dentre câncer de mama, câncer gástrico, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer uterino, carcinoma do duto salivar, melanoma, câncer de cólon e câncer de esôfago. Em algumas modalidades, o tumor sólido é selecionado dentre câncer de mama positivo para HER2, adenocarcinoma gástrico e câncer de próstata.

Combinação de Composto 1 e Vacina de Neoantígeno:

[0154] Em várias modalidades, um paciente que tem um câncer conforme descrito no presente documento pode ser tratado com uma combinação do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e uma vacina de neoantígeno. Em várias modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é administrado por si só e/ou como parte de um conjugado ou composição.

[0155] Conforme usado no presente documento, o termo "vacina de neoantígeno" se refere a uma amostra agrupada de peptídeos de neoantígeno ou mRNAs, por exemplo, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, ou mais peptídeos de neoantígeno. O termo "vacina" se refere a uma composição para gerar imunidade para a profilaxia e/ou tratamento de uma doença (por exemplo, um distúrbio neoplásico, por exemplo, uma malignidade hematológica ou tumor sólido). Consequentemente, vacinas são medicamentos que compreendem agentes imunogênicos e devem ser usados em seres humanos ou animais para gerar defesa específica e substância protetora através de vacinação. Uma vacina de neoantígeno pode incluir adicionalmente um carreador, diluente, excipiente e/ou adjuvante farmacologicamente aceitável.

[0156] Como usado no presente documento, o termo "imunogênico" se refere a qualquer agente ou composição que possa elicitar uma resposta imunológica, por exemplo, uma resposta de células T. A resposta

imunológica pode ser mediada por anticorpo ou mediada por células, ou ambas.

[0157] Em algumas modalidades, um paciente recebe o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e então recebe uma vacina de peptídeo ou mRNA de neoantígeno conhecido para aprimorar a resposta imunológica nos neoantígenos produzidos pelo Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas outras modalidades, um paciente recebe o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e é examinado para neoantígenos produzidos pelo tratamento. Subsequentemente, um ou mais desses neoantígenos são usados para criar uma vacina personalizada que é administrada ao paciente. Em qualquer uma das modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e/ou a vacina de peptídeo ou mRNA pode ser administrada ao paciente uma vez ou repetidamente.

[0158] Em várias modalidades, um neoantígeno adequado para uma vacina pode ser identificado examinando-se um painel de transcrições com splicing alterado e expressão robusta de uma ou mais amostras de tecido em um paciente (por exemplo, de uma biópsia de tumor). Em algumas modalidades, sequências de proteínas variantes são identificadas na amostra examinada com base na tradução através da junção de mRNA submetida a splicing de forma aberrante enquanto retêm porções da sequência de proteínas (até 12 aminoácidos) que flanqueiam as alterações de aminoácido geradoras de junção. Em algumas modalidades, os fragmentos de peptídeo geradores de junção são examinados quanto à ligação de alta afinidade a alelos MHC1, por exemplo, com o uso de uma ferramenta como NetMHC1 (Nielsen et al. (2003) *Protein Sci* 12(5):1,007 a 1,017; Andretta e Neilsen (2016) *Bioinformatics* 32(4):511 a 517). Estes resultados permitem a filtragem dos neopeptídeos para aqueles que são ligantes de alta afinidade previstos para uma composição de alelo HLA de paciente exclusivo, bem como a montagem de grupos de neopeptídeos previstos para se ligarem amplamente aos alelos HLA que estão

presentes com altas frequências em diferentes populações (Maiers et al. (2007) Hum Immunol 68(9):779 a 788). Em várias modalidades, os neoepípteos identificados são, então, formulados como uma vacina, por exemplo, por conjugação a um carreador ou adjuvante adequado (Ott et al. (2017) Nature 547(7662):217-21), ou para entrega como um mRNA (Sahin et al. (2017) Nature 547(7662):222-6).

[0159] Em algumas modalidades, o neoantígeno selecionado é com base em um exame de uma resposta tumoral individual do paciente ao Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em outras modalidades, um neoantígeno é escolhido, por exemplo, com base no exame de um painel de amostras a partir de diferentes pacientes para identificar neoantígenos comuns produzidos pelo Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e, então, usados como uma vacina universal para futuros pacientes. Sem se ater à teoria, essa última opção evitaria a necessidade de sequenciar e analisar a situação de mutação única de cada tumor do paciente uma vez que os neoantígenos escolhidos não são dependentes da mutação tumoral, porém, em vez disso, imitam um neoantígeno produzido pelo Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e são reconhecidos pelo corpo como estranhos. Isso pode permitir a formulação de uma vacina a granel que seria amplamente imunogênica para uma grande porcentagem de pacientes, acelerando o início de um regime de tratamento. Pacientes seriam vacinados de acordo com as programações apresentadas acima e, depois da conclusão da vacinação, poderiam ser tratados, adicionalmente, com o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, para induzir a expressão dos peptídeos de neoantígeno. Em algumas modalidades, os pacientes podem receber o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, antes, ao mesmo tempo ou após a vacinação. Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e/ou vacina podem ser administrados uma ou mais de uma vez.

[0160] Em várias modalidades, uma vacina pode compreender um ou mais de um peptídeo ou mRNA de neoantígeno. Em várias modalidades, uma vacina pode compreender um ou mais de um peptídeo ou de neoantígeno longo. Tais peptídeos de neoantígeno "longos", em várias modalidades, passam por internalização eficiente, processamento e apresentação cruzada em células de apresentação de antígeno profissionais, tais como células dendríticas, e demonstraram induzir células T citotóxicas em seres humanos (Melief e van der Burg (2008) Nat Rev Cancer 8(5):351 a 360). Em várias modalidades, um peptídeo de neoantígeno é estendido para compreender a própria sequência de peptídeos de neoantígeno além das sequências de aminoácidos flanqueadoras. Em várias modalidades, a sequência de peptídeos estendida facilita a absorção de proteína por células apresentadoras de antígenos, por exemplo, células dendríticas. Em várias modalidades, a sequência de peptídeos estendidas permite a apresentação de antígeno e iniciação de células T eficientes em modelos com isótipos de HLA diferentes.

[0161] Em algumas modalidades, uma vacina de neoantígeno compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno. Em algumas modalidades, uma vacina de neoantígeno compreende pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 15 ou pelo menos 20 peptídeos de neoantígeno. Em algumas modalidades, o peptídeo (ou peptídeos) de neoantígeno está na faixa de cerca de 5 a cerca de 50 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o peptídeo (ou peptídeos) de neoantígeno está na faixa de cerca de 10 a cerca de 35 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o peptídeo (ou peptídeos) de neoantígeno está na faixa de cerca de 15 a cerca de 25 aminoácidos de comprimento.

[0162] Em várias modalidades, a presente revelação fornece um método de tratamento de um indivíduo que tem ou suspeita ter um distúrbio neoplástico administrando-se ao indivíduo uma quantidade eficaz do Composto

1, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo; e uma vacina de neoantígeno. Em várias modalidades, o Composto 1, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, é administrado por si só e/ou como parte de um conjugado ou composição. Uma vacina de neoantígeno pode ser, por exemplo, uma vacina de peptídeo ou de neoantígeno de mRNA. Também são fornecidas no presente documento, em várias modalidades, vacinas de neoantígeno que compreendem pelo menos um peptídeo de neoantígeno ou pelo menos um mRNA de neoantígeno. Em algumas modalidades, uma vacina de neoantígeno compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno. Em algumas outras modalidades, uma vacina de neoantígeno compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno.

[0163] Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno. Em algumas modalidades, o pelo menos um peptídeo de neoantígeno está na faixa de cerca de 10 a cerca de 35 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o pelo menos um peptídeo de neoantígeno está na faixa de cerca de 15 a cerca de 25 aminoácidos de comprimento.

[0164] Em algumas modalidades, o pelo menos um peptídeo de neoantígeno compreende uma sequência de neoantígenos conhecida. Em algumas modalidades, a sequência de neoantígenos conhecida é uma vacina de neoantígeno personalizada para o indivíduo. Em algumas modalidades, a sequência de neoantígenos conhecida foi identificada sequenciando-se pelo menos um neoantígeno induzido no indivíduo administrando-se uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, o pelo menos um peptídeo de neoantígeno compreende uma sequência de neoantígenos modificada ou inovadora induzida colocando-se uma célula neoplásica em contato com uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, a célula neoplásica está presente em uma cultura celular in vitro. Em algumas modalidades, a célula neoplásica é obtida a partir

do indivíduo. Em algumas modalidades, a célula neoplásica está presente no indivíduo.

[0165] Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno e um carreador farmacologicamente aceitável. Em várias modalidades, um peptídeo de neoantígeno ou mRNA pode estar ligado a um carreador adequado para ajudar a eliciar uma resposta imunológica. Carreadores exemplificativos para ligação a agentes imunogênicos (por exemplo, um peptídeo de neoantígeno ou mRNA) incluem albuminas séricas, hemocianina de lapa, moléculas de imunoglobulina, tireoglobulina, ovalbumina, toxoide do tétano ou um toxoide de outra bactéria patogênica, como difteria, *E. coli*, cólera, ou *H. pylori*, ou um derivado de toxina atenuada. Outros carreadores para estimular ou acentuar uma resposta imunológica incluem citocinas, como IL-1, IL-1 α e β peptídeos, IL-2, γ INF, IL-10, GM-CSF e quimiocinas, como MIP1 α e β e RANTES. Os agentes imunogênicos podem também ser ligados a peptídeos que acentuam o transporte através de tecidos, conforme descrito, por exemplo, no documento nº WO 97/17613 e documento nº WO 97/17614. Em algumas modalidades, o carreador farmacologicamente aceitável é escolhido dentre um peptídeo, uma albumina sérica, uma hemocianina de lapa, uma imunoglobulina, uma tireoglobulina, uma ovalbumina, um toxoide ou um derivado de toxoide atenuado, uma citocina e uma quimiocina.

[0166] Em algumas modalidades, o peptídeo de neoantígeno pode ser ligado ao carreador farmacologicamente aceitável. Os agentes imunogênicos podem ser ligados a carreadores por reticulação química. As técnicas para ligar um peptídeo imunogênico a um carreador incluem a formação de ligações dissulfeto com o uso de propionato de N-succinimidil-3-(2-piridil-tio) (SPDP) e cicloexano-1-carboxilato de succinimidil 4-(N-maleimidometila) (SMCC) (se o peptídeo for desprovido de um grupo sulfidril, isso pode ser fornecido pela adição de um resíduo de cisteína). Esses reagentes criam uma ligação dissulfeto entre os mesmos e a cisteína de

peptídeo reside em uma proteína e uma ligação amida através do épsilon-amino em uma lisina, ou outro grupo amino livre em outros aminoácidos. Uma variedade de tais agentes formadores de dissulfeto/amida é descrita em Jansen et al. ((1982) Immun Rev. 62:185). Outros agentes de acoplamento bifuncionais formam um tioéter em vez de uma ligação dissulfeto. Muitos desses agentes formadores de tioéter estão comercialmente disponíveis e incluem ésteres reativos de ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético e ácido 2-iodoacético, ácido 4- (N-maleimido-metil)cicloexano-1-carboxílico. Os grupos carboxila podem ser ativados combinando os mesmos com succinimida ou ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfônico, sal de sódio. Em algumas modalidades, o peptídeo de neoantígeno e o carreador farmacologicamente aceitável estão ligados covalentemente através de um ligante.

[0167] Neoantígeno e outros peptídeos imunogênicos podem também ser expressos como proteínas de fusão com carreadores. O peptídeo imunogênico pode ser ligado na terminação amino, terminação carboxila ou em um local em qualquer parte do peptídeo (internamente) ao carreador. Em algumas modalidades, múltiplas repetições do peptídeo imunogênico podem estar presentes na proteína de fusão. Em algumas modalidades, o peptídeo de neoantígeno e o carreador farmacologicamente aceitável são expressos como uma proteína de fusão.

[0168] Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno e um diluente farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno e um adjuvante farmacologicamente aceitável (por exemplo, um adjuvante conforme descrito no presente documento).

[0169] Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno. Em algumas modalidades, o pelo menos um mRNA de neoantígeno codifica uma sequência de neoantígenos conhecida. Em algumas modalidades, a sequência de

neoantígenos conhecida é uma vacina de neoantígeno personalizada para o indivíduo. Em algumas modalidades, a sequência de neoantígenos conhecida foi identificada sequenciando-se pelo menos um neoantígeno induzido no indivíduo administrando-se uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, o pelo menos um mRNA de neoantígeno codifica uma sequência de neoantígenos modificada ou inovadora induzida colocando-se uma célula neoplásica em contato com uma quantidade eficaz de Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Em algumas modalidades, a célula neoplásica está presente em uma cultura celular *in vitro*. Em algumas modalidades, a célula neoplásica é obtida a partir do indivíduo. Em algumas modalidades, a célula neoplásica está presente no indivíduo.

[0170] Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno e um carreador farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, o pelo menos um mRNA de neoantígeno está ligado ao carreador farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, o carreador farmacologicamente aceitável é escolhido dentre um peptídeo, uma albumina sérica, uma hemocianina de lapa, uma imunoglobulina, uma tiroglobulina, uma ovalbumina, um toxoide ou um derivado de toxoide atenuado, uma citocina e uma quimiocina.

[0171] Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno e um diluente farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, a vacina de neoantígeno compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno e um adjuvante farmacologicamente aceitável (por exemplo, um adjuvante conforme descrito no presente documento).

[0172] Em algumas modalidades, o mRNA de neoantígeno é encapsulado por um agente de encapsulação. Em algumas modalidades, o agente de encapsulação protege o mRNA de neoantígeno contra a degradação e aprimora a entrega de vacina (McNamara et al. (2015) J Immunol Res.

2015:794528). Em algumas modalidades, o agente de encapsulação é um lipossoma. Em algumas modalidades, o lipossoma é um lipossoma catiônico como cloreto de N-[1-(2,3-dioleoxi)propil]-N,N,N-trimetil amônio 1 (DOTAP). Em algumas modalidades, o agente de encapsulação é uma nanopartícula. Em algumas modalidades, a nanopartícula protege o mRNA de neoantígeno contra a degradação de nuclease e/ou aumenta a absorção celular e/ou a eficiência de entrega. Em algumas modalidades, a nanopartícula pode ser manipulada para ser completamente degradável. Em algumas modalidades, a nanopartícula é uma nanopartícula estruturada de núcleo-casca biodegradável com um núcleo de poli (b-aminoéster) (PBAE) responsivo ao pH envelopado por uma casca de fosfolípido (Su et al. (2011) Mol Pharm. 8(3):774 a 787). Em algumas modalidades, tais nanopartículas são particularmente eficientes para entregar mRNA in vivo e eliciar uma resposta imunológica antitumoral.

[0173] Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 150 mutações ou menos. Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 100 mutações ou menos. Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 50 mutações ou menos. Em algumas modalidades, o indivíduo tem ou se suspeita que tenha um distúrbio neoplásico, por exemplo, uma malignidade hematológica ou um tumor sólido. Em algumas modalidades, a malignidade hematológica é selecionada dentre uma malignidade de célula B, uma leucemia, um linfoma e um mieloma. Em algumas modalidades, a malignidade hematológica é selecionada dentre leucemia mieloide aguda e mieloma múltiplo. Em algumas modalidades, o tumor sólido é selecionado dentre câncer de mama, câncer gástrico, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer uterino, carcinoma do duto salivar, melanoma, câncer de cólon e câncer de esôfago. Em algumas modalidades, o tumor sólido é selecionado dentre câncer de mama positivo para HER2, adenocarcinoma gástrico e câncer de próstata.

[0174] Como usado no presente documento, "adjuvante" se refere

a uma substância que tem capacidade de aumentar, amplificar ou modular uma resposta imunológica a um agente imunogênico correspondente, por exemplo, um peptídeo de neoantígeno ou mRNA. Em certas modalidades, um neoantígeno da presente revelação pode ser administrado em combinação com adjuvantes, ou seja, substâncias que não causam respostas imunológicas adaptativas, porém amplificam ou modulam a resposta a um neoantígeno correspondente. Uma variedade de adjuvantes pode ser usada em combinação com os neoantígenos revelados para eliciar uma resposta imunológica. Adjuvante (ou adjuvantes) preferencial aumenta a resposta intrínseca ao neoantígeno sem causar alterações conformacionais no neoantígeno que poderiam afetar a forma qualitativa da resposta.

[0175] Em certas modalidades, o adjuvante é um sal de alumínio (alume), como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio e sulfato de alumínio. Tais adjuvantes podem ser usados com ou sem outros agentes imunoestimuladores como monofosforil lipídeo A 3 des-O-acilado (MPL) ou 3-DMP, aminoácidos poliméricos ou monoméricos como ácido poliglutâmico ou polilisina. Tais adjuvantes podem ser usados com ou sem outros agentes imunoestimuladores específicos como peptídeos de muramila (por exemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitóxi propilamida (DTP-DPP)), ou outros componentes da parede celular bacteriana. Outros adjuvantes são emulsões de óleo em água e incluem (a) MF59 (WO 90/14837), que contém 5% de esqualeno, 0,5% de Tween 80 e 0,5% de Span 85 (que contém, opcionalmente, várias quantidades de MTP-PE) formuladas em partículas submicrônicas com o uso de um microfluidizador como o microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics), (b) SAF, que contém Esqualeno a 10%, Tween 80 a 0,4%, polímero bloqueado com pluronic L121 e thr-MDP a 5%, microfluidizado em uma emulsão submicrônica ou submetido a vórtex para

gerar uma emulsão de tamanho de partícula maior, e (c) sistema adjuvante de RibitTM (RAS), (Ribi ImmunoChem) que contém esqualeno a 2%, Tween 80 a 0,2% e um ou mais componentes de parede celular bacteriana do grupo que consiste em monofosforilipídeo A (MPL), dimicolato de trealose (TDM) e esqueleto de parede celular (CWS), por exemplo, MPL-FCWS (DetoxTM). Em algumas modalidades, o adjuvante é uma saponina, como StimulonTM (QS21) ou partículas geradas a partir do mesmo como ISCOMs (complexos imunoestimulantes) e ISCOMATRIX. Outros adjuvantes incluem Adjuvante Completo de Freund (CFA) e Adjuvante Incompleto de Freund (IFA), citocinas, como interleucinas (IL-1, IL-2 e IL-12), fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) e fator de necrose tumoral (TNF).

[0176] Um adjuvante pode ser administrado com um agente imunogênico (por exemplo, um peptídeo de neoantígeno ou mRNA) como uma única composição, ou pode ser administrado antes, durante ou após a administração do agente imunogênico. Em algumas modalidades, o agente imunogênico e o adjuvante podem ser acondicionados e fornecidos no mesmo frasco ou podem ser acondicionados em frascos separados e misturados antes do uso. Em algumas modalidades, o agente imunogênico e o adjuvante podem ser acondicionados com uma identificação, indicando a aplicação terapêutica destinada. Em algumas modalidades, se o agente imunogênico e o adjuvante forem acondicionados separadamente, o empacotamento pode incluir instruções para mistura antes do uso. A seleção de um adjuvante e/ou veículo depende da estabilidade da formulação imunogênica contendo o adjuvante, da via de administração, do programa de dosagem, da eficácia do adjuvante para a espécie a ser vacinada e, em seres humanos, um adjuvante farmacologicamente aceitável é um que foi aprovado ou é aprovável para administração humana por corpos reguladores pertinentes. Por exemplo, o adjuvante Completo de Freund não é adequado para administração humana. Entretanto, alume, MPL ou adjuvante Incompleto de Freund (Chang et al. (1998) *Adv Drug Deliv Rev.* 32:173-186) individualmente ou opcionalmente em

combinação com qualquer um dentre alume, QS21 e MPL e todas as combinações dos mesmos são adequadas para administração humana.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: SÍNTESE DE COMPOSTO 1

[0177] Além da síntese exemplificativa do Composto 1 apresentada abaixo, a síntese do Composto 1 é descrita no Documento de Patente nº U.S. 9.481.669 B2 e no Pedido Internacional nº PCT/US2016/062525, em que todos estão incorporados a título de referência.

[0178] O aquecimento por micro-ondas foi feito com o uso de um micro-ondas Biotage Emrys Liberator ou Initiator. A cromatografia em coluna foi realizada com o uso de um Isco Rf200d. A remoção do solvente foi realizada com o uso de um evaporador rotativo Büchi ou um evaporador centrífugo Genevac. A LC/MS preparatória foi conduzida com o uso de um autopurificador Waters e coluna 19 x 100 mm XTerra 5 micron MS C18 sob condição de fase móvel ácida. Os espectros de RMN foram registrados com o uso de um espectrômetro de Varian de 400 MHz.

[0179] Quando o termo "inerte" for usado para descrever um reator (*por exemplo*, um vaso de reação, frasco, reator de vidro e similares), significa que o ar no reator foi substituído por um gás inerte essencialmente isento de umidade ou seco (como nitrogênio, argônio e similares).

As seguintes abreviações são usadas no presente documento:

MeOH: Metanol

DMF: Dimetilformamida

KHMDS: bis(Trimetilsilil)amida de potássio

LCMS: Cromatografia líquida - espectrometria de massa

TBS Cl: cloreto de terc-butildimetilsilila

THF: Tetra-hidrofurano

TLC: Cromatografia de camada fina

[0180] Materiais: Os seguintes compostos estão disponíveis comercialmente e/ou podem ser preparados de várias maneiras bem

conhecidas pelos versados na técnica de síntese orgânica. Compostos de Fórmula I podem ser preparados com o uso das reações e técnicas descritas no presente documento. Na descrição dos métodos sintéticos descritos abaixo, deve-se entender que todas as condições de reação propostas, incluindo a escolha do solvente, a atmosfera da reação, a temperatura da reação, a duração do experimento e os procedimentos de análise, podem ser selecionados escolhidas como as condições padrão para essa reação, salvo indicação em contrário. Será entendido por um versado na técnica de síntese orgânica que a funcionalidade presente em várias porções da molécula deve ser compatível com os reagentes e reações propostos. Substituintes não compatíveis com as condições de reação são evidentes para o versado na técnica, e métodos alternativos são, portanto, indicados. Os materiais de partida para os exemplos estão disponíveis comercialmente ou são prontamente preparados por métodos padrão a partir de materiais conhecidos.

Informações de LCMS

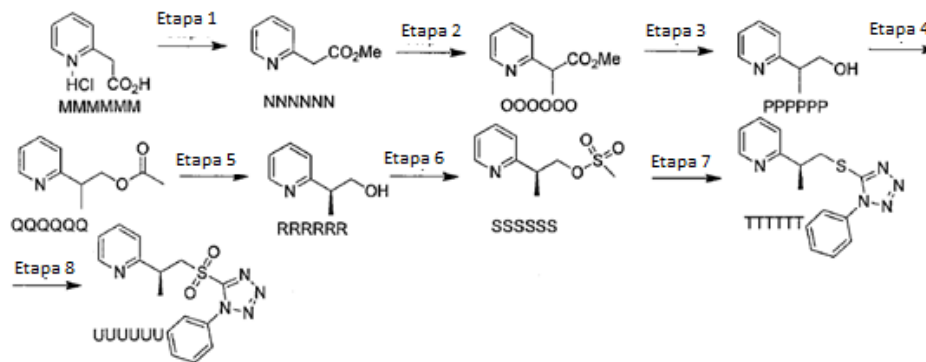
Fases móveis: A (ácido fórmico a 0,1% em H₂O) e B (ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila).

Gradiente: B 5% → 95% em 1,8 minutos.

Coluna: Coluna Acquity BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 50 mm).

[0181] Documentos de Patente nº U.S. 7.884.128 e 7.816.401, ambos intitulados: Process for Total Synthesis of Pladienolide B and Pladienolide D, descrevem métodos conhecidos na técnica para síntese de Pladienolida B e D. A Síntese de Pladienolida B e D também pode ser realizada usando métodos conhecidos na técnica e descritos por Kanada et al. Em "*Total Synthesis of the Potent Antitumor Macrolides Pladienolide B and D*", *Angew. Chem. Int. Ed.* 46:4,350 a 4,355 (2007). Kanada et al. e publicação de pedido PCT nº WO 2003/099813, intitulada: Novel Physiologically Active Substances, descrevem métodos conhecidos na técnica para a síntese de E7107 (Composto 45 de WO '813) a partir de Pladienolida D (11107D de WO' 813). Um documento de Patente U.S. correspondente é 7.550.503 de Kotake et al.

Síntese de (S)-2-(1-((1-fenil-1H-tetrazol-5-il)sulfonyl)propan-2-il)piridina



[0182] Etapa 1: A uma solução de sal de cloridrato de ácido 2-(piridin-2-il)acético **MMMMMM** (50,0 g, 288,0 mmol, 1,0 equiv.) em metanol (500 ml, 0,5 M) a 0 °C foi adicionado cloreto de tionila (31,5 ml, 432,0 mmol, 1,5 equiv.) por gotejamento. A reação foi agitada a 0 °C por 60 minutos ou até a reação ser determinada como concluída por LCMS ou TLC. A reação foi cuidadosamente bruscamente arrefecida com carbonato de sódio e a camada aquosa extraída com acetato de etila. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água, salmoura, secas com sulfato de magnésio, filtradas e concentradas a vácuo. O produto resultante (**NNNNNN**, 41,5 g, 275,0 mmol, 95%) foi usado na etapa seguinte sem purificação adicional.

[0183] Etapa 2: A uma solução de éster **NNNNNN** (41,5 g, 275,0 mmol, 1,0 equiv.) em THF (1500 ml, 0,2 M) a 0 °C foi adicionado 2-metilpropan-2-olato de sódio (28,6 g, 288,3 mmol, 1,05 equiv.) e a mistura de reação foi agitada por 30 minutos a 0 °C antes da adição de iodometano (34,3 ml, 549,1 mmol, 2,0 equiv.). A reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora ou até a reação ser determinada como concluída por LCMS ou TLC. A reação foi bruscamente arrefecida com cloreto de amônio e o excesso de solvente foi removido a vácuo. O material bruto foi, então, extraído com acetato de etila. As

camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura e secas sobre sulfato de magnésio. Após filtração, a mistura foi concentrada em vácuo. O éster metílico resultante (**OOOOOO**, 41,3 g, 250 mmol, 91%) foi avançado sem purificação.

[0184] Etapa 3: A uma solução de éster metílico **OOOOOO** (43,0 g, 260,3 mmol, 1,0 equiv.) em THF (1500 ml, 0,1 M) a 0 °C foi adicionada uma solução de hidreto de lítio e alumínio (312 ml, 312,4 mmol, 1,2 equiv., em THF) por gotejamento. A reação foi deixada para aquecer gradualmente até 0 °C por 30 minutos e, então, até a temperatura ambiente por 1 hora ou até a reação ser determinada como concluída por LCMS ou TLC. A reação foi arrefecida de maneira cuidadosamente brusca com água, hidróxido de sódio e água. Após a agitação da mistura por 30 minutos, o precipitado branco foi removido por filtração e o solvente foi removido a vácuo. A reação foi, então, extraída com éter dietílico e as frações orgânicas combinadas foram lavadas com água, salmoura, secas com sulfato de magnésio, filtradas e concentradas a vácuo. O álcool resultante (**PPPPPP**, 30,0 g, 219,0 mmol, 84%) foi avançado sem purificação.

[0185] Etapa 4: A uma solução de álcool **PPPPPP** (30,0 g, 219,0 mmol, 1,0 equiv.) em diclorometano (700 ml, 0,3 M) a 0 °C foi adicionada trietilamina (61,5 ml, 437,4 mmol, 2,0 equiv.) e DMAP (2,7 g, 21,9 mmol, 0,1 equiv.). Anidrido acético (24,8 ml, 262,4 mmol, 1,2 equiv.) foi adicionada e a mistura de reação foi agitada por 30 minutos ou até a reação ser determinada como concluída por LCMS ou TLC. A reação foi bruscamente arrefecida com cloreto de amônio, a camada orgânica foi lavada com salmoura, seca com sulfato de magnésio e filtrada. A solução resultante foi, então, evaporada e o acetato bruto (**QQQQQQ**, 37,0 g, 206,0 mmol, 94%) foi usado na etapa seguinte sem purificação adicional.

[0186] Etapa 5: Uma solução de acetato **QQQQQQ** (39,4 g, 219,8 mmol, 1,0 equiv.) foi dissolvida em éter dietílico (100 ml) e, então, 118 g de gel de sílica foi adicionado. O excesso de éter foi removido em vácuo e o

sólido bruto foi, então, diluído em tempão aquoso de pH 7 (1,970 ml, 0,1 M) (hidróxido de sódio/fosfato de sódio monobásico/água). Lipase pancreática suína tipo II (3,3 g, (15 mg/mmol)) foi adicionada e a reação foi agitada a 37 °C por quatro horas ou até ser determinada como concluída por TLC ou LCMS. (Após quatro horas, a conversão atingiu 40% de acordo com ELSD e o excesso enantiomérico foi determinado por SFC quiral e mostrou uma razão enantiomérica de 13:1 S:R). (Condição de SFC: Investigador de SFC (Waters/Thar), software: Chromscope v1.2, método: Isocrático, cossolvente a 15%, 95:5 de Heptano:IPA +0,1% de DEA durante 10 minutos, Coluna: Lux-Amilose-2, 4,6x250 mm, 5 µm, Fluxo Total: 4 ml/min (3,80 ml de bomba de CO₂, 0,20 ml de bomba modificadora), temperatura de forno definida em 35 °C e pressão de sistema definida em 100 bar, Tempos de Retenção: enantiômero (S) desejado e principal 6,9 min, enantiômero (R) menor 8,4 min). O gel de sílica foi removido por filtração e a camada aquosa foi extraída com acetato de etila três vezes. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secas com sulfato de magnésio e concentradas. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexanos/acetato de etila como eluente) para produzir o álcool desejado (**RRRRRR**, 12,5 g, 91 mmol, 41%).

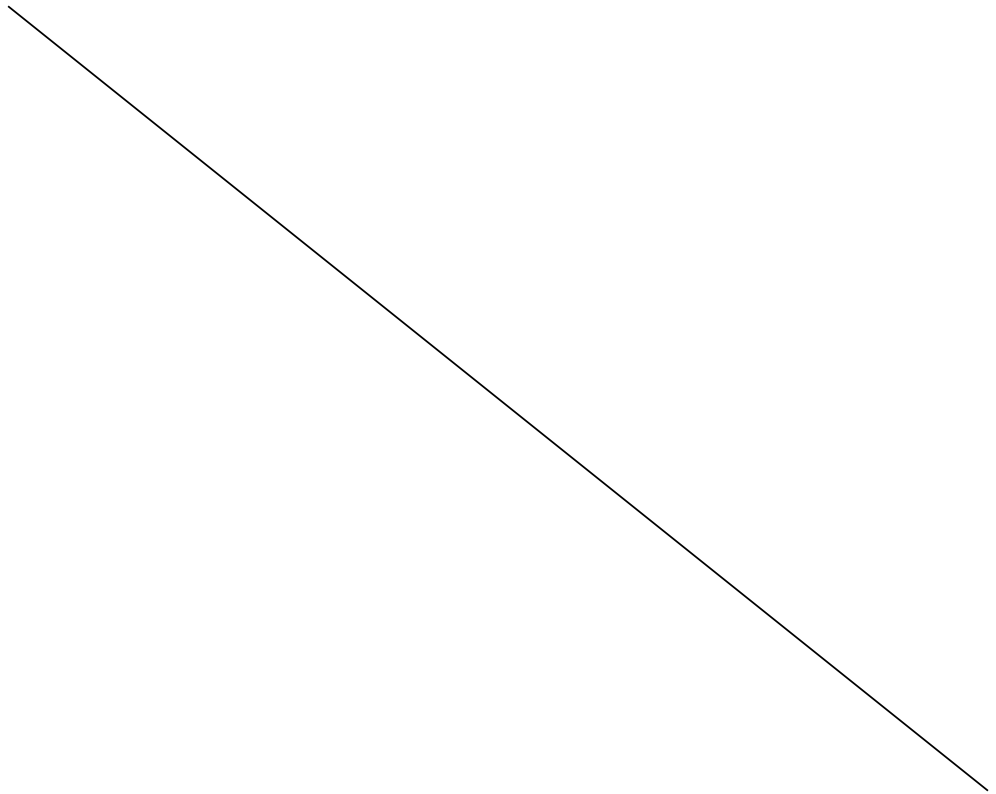
[0187] Etapa 6: A uma solução de álcool **RRRRRR** (12,5 g, 91,0 mmol, 1,00 equiv.) em diclorometano (570 ml, 0,16 M) em temperatura ambiente foi adicionado trietilamina (13,9 ml, 100,1 mmol, 1,1 equiv). A reação foi resfriada até 0 °C e, então, cloreto de cloreto de metanossulfonila (7,44 ml, 95,5 mmol, 1,05 equiv.) foi adicionado. A reação foi agitada a 0 °C durante 30 minutos ou até ser determinada como concluída por TLC ou LCMS. A reação foi bruscamente arrefecida com bicarbonato de sódio e as camadas foram separadas. A camada aquosa foi, então, extraída com diclorometano. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secas com sulfato de magnésio e concentradas a vácuo. O sulfonato resultante **SSSSSS** (19,2 g, 89 mmol, 98%) foi avançado sem purificação adicional.

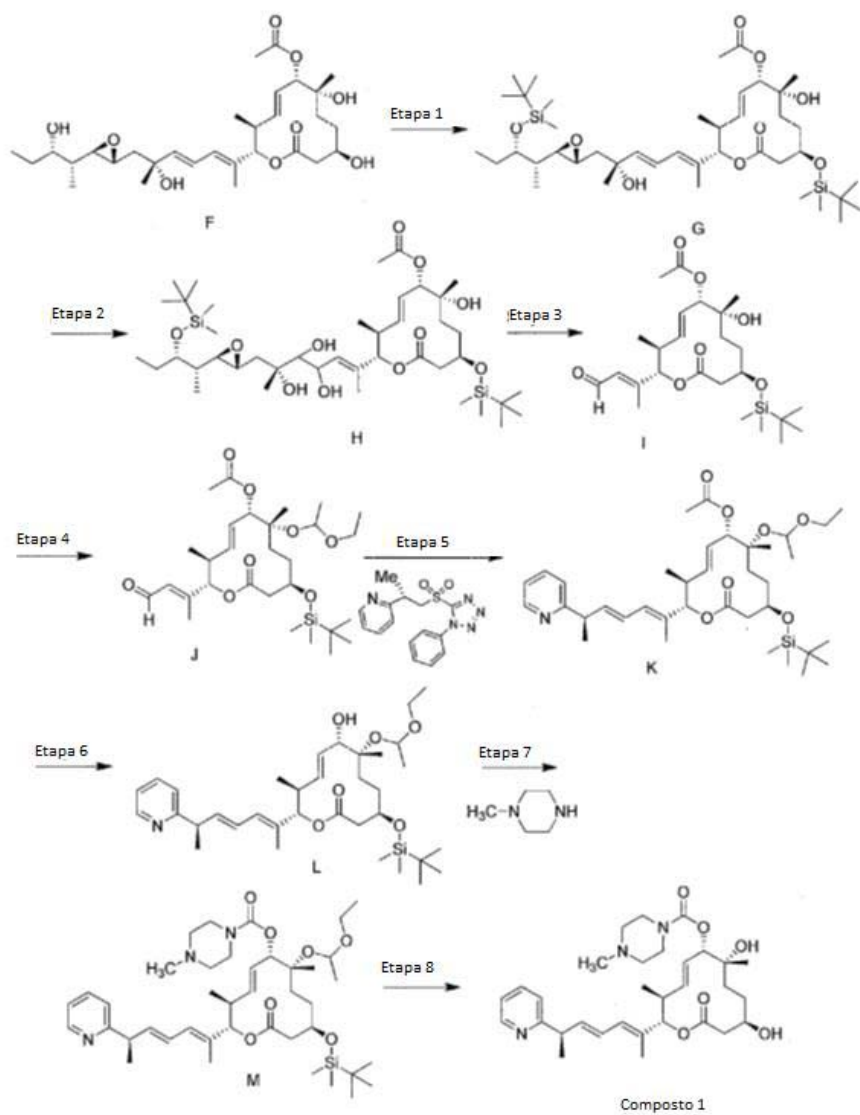
[0188] Etapa 7: A uma solução de sulfonato **SSSSSS** (19,2 g, 89 mmol, 1,0 equiv.) em DMF (120 ml, 0,1 M) à temperatura ambiente foi adicionado carbonato de céσιο (40,7 g, 125,0 mmol, 1,4 equiv.) e 1-fenil-1H-tetrazol-5-tiol (19,1 g, 107,1 mmol, 1,2 equiv.). A mistura resultante foi agitada a 50 °C durante 48 horas ou até ser determinada como concluída por TLC ou LCMS. Após resfriar a mistura até a temperatura ambiente, salmoura foi adicionada e a camada aquosa foi extraída três vezes com éter dietílico. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água, salmoura e secas sobre sulfato de magnésio. Após a filtração, o solvente foi removido a vácuo e o resíduo foi purificado com o uso de cromatografia em coluna de gel de sílica (hexanos/acetato de etila) para render o produto desejado (**TTTTTT**, 28,9 g, 88 mmol, 99%).

[0189] Etapa 8: A uma solução de sulfeto **TTTTTT** (31,5 g, 105,9 mmol, 1,0 equiv.) em EtOH (700 ml, 0,1 M) a -10 °C foi adicionado molibdato de amônio tetra-hidratado (6,5 g, 5,3 mmol, 0,05 equiv.) e peróxido de hidrogênio (108 ml, 1,060 mmol, 5,0 equiv., solução aquosa a 33%). A reação foi agitada a -10 °C durante quatro horas ou até ser determinada como concluída por TLC ou LCMS. A reação foi bruscamente arrefecida com água e solução de metabissulfito de sódio. O produto bruto foi coletado por filtração e foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexanos/acetato de etila como eluente) para produzir o produto desejado (**UUUUUU**, 23,2 g, 70,4 mmol, 66%). RMN de ¹H (400 MHz, CLOROFÓRMIO-d) δ: 1,50 (d, *J*=7,03 Hz, 3 H) 1,66 (br. s., 1 H) 3,75 (m, 1 H) 3,94 (dd, *J*=14,81, 5,02 Hz, 1 H) 4,55 (dd, *J*=14,68, 7,91 Hz, 1 H) 7,14-7,22 (m, 2 H) 7,29 (s, 1 H) 7,57-7,70 (m, 6 H) 8,44-8,49 (m, 1 H).

[0190] O óleo incolor foi, então, recristalizado com o uso de tolueno/heptano (1/1) (1 ml de tolueno e 1 ml de heptano por 100 mg de composto). Aquecer suavemente a mistura para misturar os dois solventes. Deixar a mistura resfriar até a temperatura ambiente por 12 h. (Se nenhuma recristalização for observada, adicionar um cristal à solução. O cristal ajudará a

conseguir cristais por meio de processo de semeadura.) Os cristais se formaram lentamente ao longo do tempo. Os mesmos poderiam ser isolados por meio de filtração ou remoção de camada líquida por meio de pipeta. Os cristais foram, então, lavados com heptano e, então, rapidamente com tolueno. O *er* da sulfona foi analisado antes e após recristalização. (Condições de SFC: Investigador de SFC (Waters/Thar), software: Chromscope v1.2, método: Isocrático, cossolvente a 10%, MeOH durante 10 minutos, Coluna: ChiralPak IC, 4,6x250 mm, 5 µm, Fluxo Total: 4 ml/min (3,80 ml da bomba de CO₂, 0,20 ml da bomba modificadora), temperatura de forno definida em 35 °C e pressão de sistema definida em 100 bar, Tempos de Retenção: enantiômero (S) desejado e principal 3,5 min, enantiômero (R) menor 3,8 min).



Síntese Exemplificativa de Composto 1**Esquema I**

[0191] Etapa 1: Síntese de acetato de (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-2-((R,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)pentan-2-il)oxiran-2-il)-6-hidroxi-6-metil-hepta-2,4-dien-2-il)-7-hidroxi-3,7-dimetil-12-oxo-oxaciclododec-4-en-6-ila. Uma solução de pladienolida D (**F**, 5,3 g, 9,7 mmol, 1,0 equiv.) sob nitrogênio em DMF (80 ml, 0,1 M) a 0 °C foi tratada com imidazol (4,6 g, 67,8 mmol, 7,0 equiv.) e TBSCI (7,3 g, 48,4 mmol, 5,0 equiv.). A reação foi deixada para aquecer até a temperatura ambiente e agitada por 20 horas, ou até a reação ser determinada como concluída por LCMS ou TLC. A reação foi extraída com acetato de etila e a camada orgânica foi lavada com salmoura, seca com sulfato de sódio, filtrada e concentrada a vácuo. O óleo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexanos/acetato de etila como eluente) para produzir o produto desejado (**G**, 7,5 g, 9,6 mmol, 99%).

[0192] Etapa 2: Síntese de acetato de (2S,3S,6S,7R, 10R,E)-10-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-2-((6R,E)-7-((2R,3S)-3-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)pentan-2-il)oxiran-2-il)-4,5,6-tri-hidroxi-6-metil-hept-2-en-2-il)-7-hidroxi-3,7-dimetil-12-oxo-oxaciclododec-4-en-6-ila. A uma solução de olefina **G** (7,6 g, 9,7 mmol, 1,0 equiv.) em TEF:H₂O desgaseificado (210 ml:21 ml, 0,01 M) sob nitrogênio a 0 °C foi adicionado tetróxido de ósmio (24,4 ml, 1,9 mmol, 0,2 equiv., 2,5% de solução em *tert*-butanol) seguido de N-óxido de N-metilmorfolina (2,3 g, 19,5 mmol, 2,0 equiv.). A reação foi deixada para aquecer até a temperatura ambiente e agitada por 13 horas, ou até a reação ser determinada como concluída por LCMS ou TLC. A reação foi bruscamente arrefecida com sulfito de sódio, diluída com acetato de etila, e a camada orgânica foi lavada com água, seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada a vácuo. O óleo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (diclorometano/metanol como eluente) para produzir o produto desejado (**H**, 6,8 g, 8,3 mmol, 86%).

[0193] Etapa 3: Síntese de acetato de (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-7-hidroxi-3,7-dimetil-12-oxo-2-((E)-4-oxobut-2-en-2-

il)oxaciclododec-4-en-6-ila. A uma solução de diol **H** (7,9 g, 9,7 mmol, 1,0 equiv.) em benzeno (350 ml, 0,03 M) sob nitrogênio à temperatura ambiente foi adicionado tetra-acetato de chumbo (8,6 g, 19,4 mmol, 2,0 equiv.). A reação foi agitada por 30 minutos, ou até a reação ser determinada como concluída por LCMS ou TLC. A reação foi concentrada e purificada por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etila como eluente) para produzir o produto desejado (**I**, 2,5 g, 5,26 mmol, 54%).

[0194] Etapa 4: Síntese de acetato de (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-(1-etoxietoxi)-3,7-dimetil-12-oxo-2-((E)-4-oxobut-2-en-2-il)oxaciclododec-4-en-6-ila. A uma solução de aldeído **I** (1,4 g, 2,9 mmol, 1,0 equiv.) em THF (9,5 ml, 0,5 M) foi adicionado etoxieteno (11,1 ml, 40,0 equiv.) e p-toluenossulfonato de piridínio (0,07 g, 0,3 mmol, 0,1 equiv.) à temperatura ambiente. A reação foi agitada por 24 horas, ou até a reação ser determinada como concluída por LCMS ou TLC. A reação foi bruscamente arrefecida com bicarbonato de sódio e diluída com acetato de etila. O acetato de etila foi lavado com água, salmoura, seco com sulfato de magnésio, filtrado e concentrado a vácuo. O óleo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etila como eluente) para produzir o produto desejado (**J**, 1,2 g, 2,2 mmol, 75%).

[0195] Etapa 5: Síntese de acetato de (2S,3S,6S,7R, 10R,E)-10-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-(1-etoxietoxi)-3,7-dimetil-12-oxo-2-((R,2E,4E)-6-(piridin-2-il)hepta-2,4-dien-2-il)oxaciclododec-4-en-6-ila. A uma solução de (S)-2-(1-((1-fenil-1H-tetrazol-5-il)sulfonil)propan-2-il)piridina (**UUUUU**) (695,0 mg, 2,1 mmol, 1,5 equiv.) em THF (20 ml, 0,06 M) sob nitrogênio a -78 °C foi adicionado KHMDS (4,2 ml, 2,1 mmol, 1,5 equiv.) por gotejamento e a reação foi agitada por 20 minutos. Então, aldeído **J** (780,0 mg, 1,4 mmol, 1,0 equiv.) em THF (1,0 ml) foi adicionado por gotejamento. A reação foi agitada a -78 °C por 90 minutos e, então, deixada para aquecer até -20 °C por 1 hora. A reação foi bruscamente arrefecida com cloreto de amônio, diluída com acetato de etila e aquecida até a temperatura ambiente. A camada orgânica foi lavada com

água, salmoura, seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada a vácuo. O óleo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etila como eluente) para produzir o produto Julia desejado (**K**, 490 mg, 0,7 mmol, 53%).

[0196] Etapa 6: Síntese de (4R,7R,8S,11S,E)-4-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-(1-etoxietoxi)-8-hidroxi-7,11-dimetil-12-((R,2E,4E)-6-(piridin-2-il)hepta-2,4-dien-2-il)oxaciclododec-9-en-2-ona. A uma solução de acetato **K** (490 mg, 0,7 mmol, 1,0 equiv.) em metanol (15 ml, 0,05 M) à temperatura ambiente foi adicionado carbonato de potássio (155 mg, 0,4 mmol, 1,5 equiv.). A reação foi realizada por 24 horas, ou até a reação ser determinada como concluída por LCMS ou TLC. A reação foi bruscamente arrefecida com água, diluída com acetato de etila, lavada com salmoura, seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada a vácuo. O sólido espumoso resultante (**L**, 459 mg, 0,7 mmol, 100%) foi avançado para a próxima etapa sem purificação adicional.

[0197] Etapa 7: Síntese de (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-(1-etoxietoxi)-3,7-dimetil-12-oxo-2-((R,2E,4E)-6-(piridin-2-il)hepta-2,4-dien-2-il)oxaciclododec-4-en-6-il 4-metilpiperazina-1-carboxilato. A uma solução de álcool **L** (459 mg, 0,7 mmol, 1,0 equiv.) em diclorometano (0,5 ml, 0,1 M) à temperatura ambiente foi adicionado N,N-dimetilaminopiridina (27,3 mg, 0,2 mmol, 0,3 equiv.) e trietilamina (1,0 ml, 7,4 mmol, 10,0 equiv.) seguido por cloroformato de 4-nitrofenila (451 mg, **2,2 mmol, 3,0 equiv.**). A reação foi agitada à temperatura ambiente durante três horas. Em seguida, N-metil-piperazina (299 mg, 2,98 mmol, 4,0 equiv.) foi adicionada à temperatura ambiente. Após agitação por uma hora, a reação foi bruscamente arrefecida com água e diluída com diclorometano. A camada orgânica foi lavada com 1 N de solução de hidróxido de sódio e a camada orgânica foi concentrada. O óleo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexanos/acetato de etila como eluente) para produzir o produto desejado (**M**, 553 mg, 0,75 mmol, 100%).

[0198] Etapa 8: Síntese de (2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-di-hidroxi-3,7-dimetil-12-oxo-2-((R,2E,4E)-6-(piridin-2-il)hepta-2,4-dien-2-il)oxaciclododec-4-en-6-il 4-metilpiperazina-1-carboxilato (Composto 1). A uma solução de éter de sílica (**M**, 553 mg, 0,74 mmol, 1,0 equiv.) em metanol (20 ml, 0,04 M) à temperatura ambiente foi adicionado ácido p-metoxitoluenossulfônico (425 mg, 2,2 mmol, 3,0 equiv.). A reação foi agitada por 3 horas, ou até a reação ser determinada como concluída por LCMS ou TLC. A reação foi bruscamente arrefecida com bicarbonato de sódio e diluída com acetato de etila. A camada orgânica foi lavada com água, salmoura, seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada a vácuo. O óleo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etila como eluente) para produzir o **Composto 1** desejado (184 mg, 0,33 mmol, 44%). RMN de ^1H (400 MHz, CLOROFÓRMIO-d) δ : 0,82-1,00 (m, 3H) 1,22-1,48 (m, 8H) 1,50-1,63 (m, 1H) 1,66-1,83 (m, 4H) 1,97 (s, 1H) 2,07 (s, 1H) 2,33 (s, 3H) 2,40 (br. s., 3H) 2,45-2,68 (m, 3H) 3,44-3,61 (m, 5H) 3,74 (dd, $J=14,2, 7,2$ Hz, 2H) 5,04 (d, $J= 9,3$ Hz, 1H) 5,17 (d, $J=10,5$ Hz, 1H) 5,57-5,76 (m, 2H) 6,02 (dd, $J=15,1, 7,5$ Hz, 1H) 6,13 (d, $J=10,8$ Hz, 1H) 6,34 (ddd, $J=15,1, 10,7, 1,0$ Hz, 1H) 7,14 (t, $J=6,2$ Hz, 1H) 7,18 (d, $J=7,4$ Hz, 1H) 7,63 (t, $J=7,3$ Hz, 1H) 8,57 (d, $J=5,1$ Hz, 1H). MS (ES+) = 556,4 [M+H].

EXEMPLO 2: ADMINISTRAÇÃO DO COMPOSTO 1 EM COMBINAÇÃO COM UM INIBIDOR DE PONTO DE VERIFICAÇÃO

Protocolo de Estudo de Eficácia: Modelo Sinérgico de Câncer de Cólon de Camundongo

[0199] Células de câncer de cólon CT26 ($0,25 \times 10^6$; nº de Cat ATCC CRL-2638) foram implantadas por via subcutânea no flanco direito de camundongos Balb/c fêmeas de oito semanas de idade (Envigo) em 100 μl de PBS desprovido de Matrigel. Permitiu-se que os tumores CT26 crescessem até uma média de $\sim 100 \text{ mm}^3$ antes de os animais terem sido inscritos no estudo de eficácia. Cada grupo de tratamento conteve 12 camundongos. Camundongos foram tratados com o Composto 1, um anticorpo anti-CTLA4 (número de

catálogo Bio X Cell: BE0164 (α CTLA4 9D9)), ou uma combinação em doses e rotas de administração conforme mostrado na Figura 1. O Composto 1 foi formulado em uma composição que contém etanol a 5% e solução de metilcelulose a 95% (metilcelulose a 0,5%). O anticorpo anti-CTLA4 foi formulado em solução de tampão de fosfato a pH 7,0. Os tumores foram medidos 3 vezes por semana por até 19 dias. Os volumes de tumor foram calculados com o uso da fórmula elipsoide:

$$\text{Volume de Tumor} = (\text{comprimento} \times \text{largura}^2)/2$$

Resultados de Estudo de Eficácia

[0200] Tratamento de animais portadores de tumores singênicos CT26 com o Composto 1 em qualquer nível de dose ou programação não resulta em atividade antitumoral notável quando curvas de crescimento foram comparadas àquelas de controles tratados com veículo (Figura 1A). Tratamento com um anticorpo que alveja o ponto de verificação imunológico CTLA4 ("anti-CTLA4") a 10 mg/kg duas vezes por semana resultou em atraso de crescimento tumoral substancial em apenas 2 dentre 12 animais (Figura 1B). No entanto, constatou-se, surpreendentemente, que após a administração do Composto 1 em combinação com anti-CTLA4, um aumento significativo na taxa de resposta foi observado (Figura 1C).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para induzir pelo menos um neoantígeno **caracterizado** pelo fato de que compreende colocar uma célula neoplásica em contato com uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, induzindo, assim, a produção de pelo menos um neoantígeno.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a célula neoplásica está presente em uma cultura celular *in vitro*.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que a célula neoplásica é obtida de um indivíduo.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a célula neoplásica está presente em um indivíduo.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que a célula neoplásica é derivada de uma malignidade hematológica ou um tumor sólido.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que a malignidade hematológica é selecionada dentre uma malignidade de célula B, uma leucemia, um linfoma e um mieloma.

7. Método, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, **caracterizado** pelo fato de que a malignidade hematológica é selecionada dentre leucemia mieloide aguda e mieloma múltiplo.

8. Método, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que o tumor sólido é selecionado dentre câncer de mama, câncer gástrico, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer uterino, carcinoma do duto salivar, melanoma, câncer de cólon e câncer de esôfago.

9. Método para induzir pelo menos um neoantígeno e/ou uma resposta de célula T em um indivíduo que tem ou que se suspeita que tenha um distúrbio neoplásico **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

10. Método para tratar um indivíduo que tem ou que se suspeita que

tenha um distúrbio neoplásico **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, induz pelo menos um neoantígeno e/ou uma resposta de célula T.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, administrada é reduzida devido à indução de pelo menos um neoantígeno e/ou uma resposta de célula T, em relação a uma dosagem padrão do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade administrada do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é reduzida em 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% ou 90%, em relação a uma dosagem padrão do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, **caracterizado** pelo fato de que o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é administrado pelo menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% ou 90% menos frequentemente, em relação a um regime de dosagem padrão do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade e/ou dosagem administrada do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, resulta em toxicidade sistêmica mais baixa e/ou tolerância aprimorada.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 14, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente administrar pelo menos uma terapia adicional.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade da pelo menos uma terapia adicional administrada é

reduzida devido à indução de pelo menos um neoantígeno e/ou uma resposta de célula T pela administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em relação a uma dosagem padrão da pelo menos uma terapia adicional.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade administrada do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, ou da pelo menos uma terapia adicional é reduzida em 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% ou 90%, em relação a uma dosagem padrão da pelo menos uma terapia adicional.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, **caracterizado** pelo fato de que o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, ou a pelo menos uma terapia adicional é administrada pelo menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% ou 90% menos frequentemente, em relação a um regime de dosagem padrão da pelo menos uma terapia adicional.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18, **caracterizado** pelo fato de que a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é iniciada antes da administração da pelo menos uma terapia adicional.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18, **caracterizado** pelo fato de que a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é iniciada após a administração da pelo menos uma terapia adicional.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18, **caracterizado** pelo fato de que a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é iniciada concomitantemente com a administração da pelo menos uma terapia adicional.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 21, **caracterizado** pelo fato de que a administração do Composto 1, ou um sal

farmaceuticamente aceitável do mesmo, é repetida pelo menos uma vez após a administração inicial.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, usada para administração repetida é reduzida em relação à quantidade usada para administração inicial.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, usada para a administração repetida é reduzida em 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% ou 90%, em relação à quantidade usada para administração inicial.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 24, **caracterizado** pelo fato de que a administração da pelo menos uma terapia adicional é repetida pelo menos uma vez após a administração inicial.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade da pelo menos uma terapia adicional usada para administração repetida é reduzida em relação à quantidade usada para administração inicial.

27. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade da pelo menos uma terapia adicional usada para administração repetida é reduzida em relação a uma dosagem padrão da pelo menos uma terapia adicional.

28. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade da pelo menos uma terapia adicional usada para administração repetida é reduzida em 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% ou 90%, em relação à quantidade usada para administração inicial.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 28, **caracterizado** pelo fato de que a administração repetida do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, é concomitante com a

administração repetida da pelo menos uma terapia adicional.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 28, **caracterizado** pelo fato de que a administração repetida do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é sequencial ou desalinhada com a administração repetida da pelo menos uma terapia adicional.

31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 30, **caracterizado** pelo fato de que a pelo menos uma terapia adicional compreende um inibidor de ponto de verificação.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo é intolerante, não responsivo ou pouco responsivo ao inibidor de ponto de verificação quando administrado sozinho.

33. Método, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de ponto de verificação tem como alvo CTLA4, PD1, PDL1, OX40, CD40, GITR, LAG3, TIM3 e/ou KIR.

34. Método, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de ponto de verificação tem como alvo CTLA4, OX40, CD40 e/ou GITR.

35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 34, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de ponto de verificação compreende um inibidor de trajetória de antígeno associado a linfócito T citotóxico 4 (CTLA4).

36. Método, de acordo com a reivindicação 33 ou 34, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de CTLA4 é um anticorpo anti-CTLA4.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA4 é ipilimumabe.

38. Método, de acordo com a reivindicação 31 ou 32, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de ponto de verificação compreende um inibidor de trajetória de morte programada 1 (PD1).

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, **caracterizado** pelo

fato de que o inibidor de PD1 é um anticorpo anti-PD1.

40. Método, de acordo com a reivindicação 39, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-PD1 é nivolumabe.

41. Método, de acordo com a reivindicação 38, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de PD1 é um anticorpo anti-PDL1.

42. Método, de acordo com a reivindicação 41, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-PDL1 é atezolizumabe.

43. Método, de acordo com a reivindicação 31 ou 32, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de ponto de verificação compreende um inibidor de CTLA4 e um inibidor de PD1.

44. Método, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de CTLA4 é um anticorpo anti-CTLA4.

45. Método, de acordo com a reivindicação 43 ou 44, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de PD1 é um anticorpo anti-PD1.

46. Método, de acordo com a reivindicação 43 ou 44, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de PD1 é um anticorpo anti-PDL1.

47. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 30, **caracterizado** pelo fato de que a pelo menos uma terapia adicional compreende administrar uma vacina de neoantígenos.

48. Método, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno.

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um peptídeo de neoantígeno está na faixa de cerca de 10 a cerca de 35 aminoácidos de comprimento.

50. Método, de acordo com a reivindicação 48 ou 49, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um peptídeo de neoantígeno está na faixa de cerca de 15 a cerca de 25 aminoácidos de comprimento.

51. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 50, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um peptídeo de neoantígeno

compreende uma ou mais do que uma sequência de neoantígenos.

52. Método, de acordo com a reivindicação 51, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de neoantígenos é uma vacina de neoantígenos personalizada para administração ao indivíduo.

53. Método, de acordo com a reivindicação 51, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de neoantígenos é uma vacina de neoantígenos universal.

54. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de neoantígenos foi identificada sequenciando-se pelo menos um neoantígeno induzido no indivíduo administrando-se uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, ao indivíduo.

55. Método, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno e um carreador farmacologicamente aceitável.

56. Método, de acordo com a reivindicação 55, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um peptídeo de neoantígeno é ligado ao carreador farmacologicamente aceitável.

57. Método, de acordo com a reivindicação 56, **caracterizado** pelo fato de que o carreador farmacologicamente aceitável é selecionado dentre um peptídeo, uma albumina sérica, uma hemocianina de lapa californiana, uma imunoglobulina, uma tiroglobulina, uma ovalbumina, um toxoide ou um derivado de toxoide atenuado, uma citocina e uma quimiocina.

58. Método, de acordo com a reivindicação 55, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo de neoantígeno e o carreador farmacologicamente aceitável são covalentemente ligados por meio de um ligante.

59. Método, de acordo com a reivindicação 55, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo de neoantígeno e o carreador farmacologicamente aceitável são expressos como uma proteína de fusão.

60. Método, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado** pelo

fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno e um diluente farmacologicamente aceitável.

61. Método, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno e um adjuvante farmacologicamente aceitável.

62. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um peptídeo de neoantígeno compreende uma sequência de neoantígenos induzida colocando-se uma célula neoplásica em contato com uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

63. Método, de acordo com a reivindicação 62, **caracterizado** pelo fato de que a célula neoplásica está presente em uma cultura celular *in vitro*.

64. Método, de acordo com a reivindicação 62 ou 63, **caracterizado** pelo fato de que a célula neoplásica é obtida do indivíduo.

65. Método, de acordo com a reivindicação 62, **caracterizado** pelo fato de que a célula neoplásica está presente no indivíduo.

66. Método, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno.

67. Método, de acordo com a reivindicação 66, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um mRNA de neoantígeno codifica uma ou mais que uma sequência de neoantígenos.

68. Método, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de neoantígenos é uma vacina de neoantígenos personalizada para o indivíduo.

69. Método, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de neoantígenos é uma vacina de neoantígenos universal.

70. Método, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de neoantígenos foi identificada sequenciando-se pelo

menos um neoantígeno induzido no indivíduo administrando-se uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

71. Método, de acordo com a reivindicação 66, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um mRNA de neoantígeno codifica uma sequência de neoantígenos induzida colocando-se uma célula neoplásica em contato com uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

72. Método, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno e um carreador farmacologicamente aceitável.

73. Método, de acordo com a reivindicação 72, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um mRNA de neoantígeno é ligado ao carreador farmacologicamente aceitável.

74. Método, de acordo com a reivindicação 73, **caracterizado** pelo fato de que o carreador farmacologicamente aceitável é selecionado dentre um peptídeo, uma albumina sérica, uma hemocianina de lapa californiana, uma imunoglobulina, uma tiroglobulina, uma ovalbumina, um toxoide ou um derivado de toxoide atenuado, uma citocina e uma quimiocina.

75. Método, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno e um diluente farmacologicamente aceitável.

76. Método, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno e um adjuvante farmacologicamente aceitável.

77. Método, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado** pelo fato de que o mRNA de neoantígeno é encapsulado por um agente de encapsulação.

78. Método, de acordo com a reivindicação 77, **caracterizado** pelo fato de que o agente de encapsulação é um lipossoma.

79. Método, de acordo com a reivindicação 78, **caracterizado** pelo fato de que o agente de encapsulação é uma nanopartícula.

80. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 30, **caracterizado** pelo fato de que a pelo menos uma terapia adicional compreende administrar uma citocina ou análogo de citocina.

81. Método, de acordo com a reivindicação 80, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo é intolerante, não responsivo ou pouco responsivo à citocina ou análogo de citocina quando administrado sozinho.

82. Método, de acordo com a reivindicação 80, **caracterizado** pelo fato de que a citocina ou análogo de citocina compreende um intensificador de célula T.

83. Método, de acordo com a reivindicação 80, **caracterizado** pelo fato de que a citocina ou análogo de citocina compreende IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IFN γ e/ou TNF α .

84. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 30, **caracterizado** pelo fato de que a pelo menos uma terapia adicional compreende administrar células T geneticamente modificadas que têm como alvo um tumor.

85. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 84, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente detectar um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T no indivíduo após a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

86. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 85, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente continuar a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, se um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T forem detectados.

87. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 85, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente continuar a

administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, menos frequentemente e/ou a uma dosagem reduzida se um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T forem detectados.

88. Método, de acordo com a reivindicação 85, **caracterizado** pelo fato de que a detecção de um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T no indivíduo indica a eficácia do tratamento com o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

89. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 88, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 150 mutações ou menos.

90. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 89, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 100 mutações ou menos.

91. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 90, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 50 mutações ou menos.

92. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 91, **caracterizado** pelo fato de que o distúrbio neoplásico é uma malignidade hematológica ou um tumor sólido.

93. Método, de acordo com a reivindicação 92, **caracterizado** pelo fato de que a malignidade hematológica é selecionada dentre uma malignidade de célula B, uma leucemia, um linfoma e um mieloma.

94. Método, de acordo com a reivindicação 92 ou 93, **caracterizado** pelo fato de que a malignidade hematológica é selecionada dentre leucemia mieloide aguda e mieloma múltiplo.

95. Método, de acordo com a reivindicação 92, **caracterizado** pelo fato de que o tumor sólido é selecionado dentre câncer de mama, câncer gástrico, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer uterino, carcinoma do duto salivar, melanoma, câncer de cólon e câncer de esôfago.

96. Método para tratar um indivíduo que tem ou que se suspeita que tenha um distúrbio neoplásico **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, induz pelo menos um neoantígeno e/ou uma resposta de célula T;

(b) detectar um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T no indivíduo após a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo; e

(c) continuar a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, se um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T forem detectados.

97. Método, de acordo com a reivindicação 96, **caracterizado** pelo fato de que a detecção de um ou mais neoantígenos e/ou uma resposta de célula T no indivíduo indica a eficácia do tratamento com o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

98. Método para tratar um indivíduo que tem ou que se suspeita que tenha um distúrbio neoplásico **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo; e pelo menos uma terapia adicional.

99. Método, de acordo com a reivindicação 98, **caracterizado** pelo fato de que a pelo menos uma terapia adicional compreende pelo menos uma, pelo menos duas, pelo menos três, pelo menos quatro ou pelo menos cinco terapias adicionais.

100. Método, de acordo com a reivindicação 98, **caracterizado** pelo fato de que a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, induz pelo menos um neoantígeno e/ou uma resposta de célula T.

101. Método, de acordo com a reivindicação 98, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade administrada do Composto 1, ou um sal

farmaceuticamente aceitável do mesmo, e/ou da pelo menos uma terapia adicional é reduzida em 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% ou 90%, em relação a uma dosagem padrão do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e/ou da pelo menos uma terapia adicional.

102. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 101, **caracterizado** pelo fato de que o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e/ou a pelo menos uma terapia adicional são administrados pelo menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% ou 90% menos frequentemente, em relação a um regime de dosagem padrão do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e/ou da pelo menos uma terapia adicional.

103. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 102, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade administrada e/ou dosagem do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e/ou da pelo menos uma terapia adicional resulta em toxicidade sistêmica mais baixa e/ou tolerância aprimorada.

104. Método, de acordo com a reivindicação 98, **caracterizado** pelo fato de que a administração do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, é iniciada antes da administração da pelo menos uma terapia adicional.

105. Método, de acordo com a reivindicação 98, **caracterizado** pelo fato de que a administração do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, é iniciada após a administração da pelo menos uma terapia adicional.

106. Método, de acordo com a reivindicação 98, **caracterizado** pelo fato de que a administração do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, é iniciada concomitantemente com a administração da pelo menos uma terapia adicional.

107. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a

106, **caracterizado** pelo fato de que a administração do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é repetida pelo menos uma vez após a administração inicial.

108. Método, de acordo com a reivindicação 107, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, usada para administração repetida é reduzida em relação à quantidade usada para administração inicial.

109. Método, de acordo com a reivindicação 107, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, usada para a administração repetida é reduzida em relação a uma dosagem padrão do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

110. Método, de acordo com a reivindicação 107, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, usada para administração repetida é reduzida em 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% ou 90%, em relação a uma dosagem padrão do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

111. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 110, **caracterizado** pelo fato de que a administração da pelo menos uma terapia adicional é repetida pelo menos uma vez após a administração inicial.

112. Método, de acordo com a reivindicação 111, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade da pelo menos uma terapia adicional usada para administração repetida é reduzida em relação à quantidade usada para a administração inicial.

113. Método, de acordo com a reivindicação 111, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade da pelo menos uma terapia adicional usada para administração repetida é reduzida em relação a uma dosagem padrão da pelo menos uma terapia adicional.

114. Método, de acordo com a reivindicação 111, **caracterizado**

pelo fato de que a quantidade da pelo menos uma terapia adicional usada para administração repetida é reduzida em 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75% ou 90%, em relação a uma dosagem padrão da pelo menos uma terapia adicional.

115. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 114, **caracterizado** pelo fato de que a administração repetida do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é concomitante com a administração repetida da pelo menos uma terapia adicional.

116. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 114, **caracterizado** pelo fato de que a administração repetida do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é sequencial ou desalinhada com a administração repetida da pelo menos uma terapia adicional.

117. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 116, **caracterizado** pelo fato de que a pelo menos uma terapia adicional compreende administrar um inibidor de ponto de verificação.

118. Método, de acordo com a reivindicação 117, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo é intolerante, não responsivo ou pouco responsivo ao inibidor de ponto de verificação quando administrado sozinho.

119. Método, de acordo com a reivindicação 117, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de ponto de verificação tem como alvo CTLA4, PD1, PDL1, OX40, CD40, GITR, LAG3, TIM3 e/ou KIR.

120. Método, de acordo com a reivindicação 117, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de ponto de verificação tem como alvo CTLA4, OX40, CD40 e/ou GITR.

121. Método, de acordo com a reivindicação 119 ou 120, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de ponto de verificação compreende um inibidor de trajetória de antígeno associado a linfócito T citotóxico 4 (CTLA4).

122. Método, de acordo com a reivindicação 121, **caracterizado**

pelo fato de que o inibidor de CTLA4 é um anticorpo anti-CTLA4.

123. Método, de acordo com a reivindicação 122, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA4 é ipilimumabe.

124. Método, de acordo com a reivindicação 119 ou 120, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de ponto de verificação compreende um inibidor de trajetória de morte programada 1 (PD1).

125. Método, de acordo com a reivindicação 124, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de PD1 é um anticorpo anti-PD1.

126. Método, de acordo com a reivindicação 125, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-PD1 é nivolumabe.

127. Método, de acordo com a reivindicação 124, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de PD1 é um anticorpo anti-PDL1.

128. Método, de acordo com a reivindicação 127, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-PDL1 é atezolizumabe.

129. Método, de acordo com a reivindicação 119 ou 120, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de ponto de verificação compreende um inibidor de CTLA4 e um inibidor de PD1.

130. Método, de acordo com a reivindicação 129, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de CTLA4 é um anticorpo anti-CTLA4.

131. Método, de acordo com a reivindicação 130, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA4 é ipilimumabe.

132. Método, de acordo com a reivindicação 129 ou 130, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de PD1 é um anticorpo anti-PD1.

133. Método, de acordo com a reivindicação 132, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-PD1 é nivolumabe.

134. Método, de acordo com a reivindicação 129 ou 130, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de PD1 é um anticorpo anti-PDL1.

135. Método, de acordo com a reivindicação 134, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-PDL1 é atezolizumabe.

136. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a

114, **caracterizado** pelo fato de que a pelo menos uma terapia adicional compreende administrar uma vacina de neoantígenos.

137. Método, de acordo com a reivindicação 136, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno.

138. Método, de acordo com a reivindicação 137, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um peptídeo de neoantígeno está na faixa de cerca de 10 a cerca de 35 aminoácidos de comprimento.

139. Método, de acordo com a reivindicação 137 ou 138, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um peptídeo de neoantígeno está na faixa de cerca de 15 a cerca de 25 aminoácidos de comprimento.

140. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 137 a 139, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um peptídeo de neoantígeno compreende uma ou mais do que uma sequência de neoantígenos.

141. Método, de acordo com a reivindicação 140, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de neoantígenos é uma vacina de neoantígenos personalizada para o indivíduo.

142. Método, de acordo com a reivindicação 140, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de neoantígenos é uma vacina de neoantígenos universal.

143. Método, de acordo com a reivindicação 140, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de neoantígenos foi identificada sequenciando-se pelo menos um neoantígeno induzido no indivíduo administrando-se uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

144. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 137 a 143, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um peptídeo de neoantígeno compreende uma sequência de neoantígenos induzida colocando-se uma célula neoplásica em contato com uma quantidade eficaz do Composto

1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

145. Método, de acordo com a reivindicação 136, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno e um carreador farmacologicamente aceitável.

146. Método, de acordo com a reivindicação 145, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um peptídeo de neoantígeno é ligado ao carreador farmacologicamente aceitável.

147. Método, de acordo com a reivindicação 145, **caracterizado** pelo fato de que o carreador farmacologicamente aceitável é selecionado dentre um peptídeo, uma albumina sérica, uma hemocianina de lapa californiana, uma imunoglobulina, uma tiroglobulina, uma ovalbumina, um toxoide ou um derivado de toxoide atenuado, uma citocina e uma quimiocina.

148. Método, de acordo com a reivindicação 145, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo de neoantígeno e o carreador farmacologicamente aceitável são covalentemente ligados por meio de um ligante.

149. Método, de acordo com a reivindicação 145, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo de neoantígeno e o carreador farmacologicamente aceitável são expressos como uma proteína de fusão.

150. Método, de acordo com a reivindicação 136, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno e um diluente farmacologicamente aceitável.

151. Método, de acordo com a reivindicação 136, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno e um adjuvante farmacologicamente aceitável.

152. Método, de acordo com a reivindicação 144, **caracterizado** pelo fato de que a célula neoplásica está presente em uma cultura celular *in vitro*.

153. Método, de acordo com a reivindicação 144 ou 152, **caracterizado** pelo fato de que a célula neoplásica é obtida do indivíduo.

154. Método, de acordo com a reivindicação 153, **caracterizado**

pelo fato de que a célula neoplásica está presente no indivíduo.

155. Método, de acordo com a reivindicação 136, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno.

156. Método, de acordo com a reivindicação 155, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um mRNA de neoantígeno codifica uma ou mais que uma sequência de neoantígenos.

157. Método, de acordo com a reivindicação 156, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de neoantígenos é uma vacina de neoantígenos personalizada para o indivíduo.

158. Método, de acordo com a reivindicação 156, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de neoantígenos é uma vacina de neoantígenos universal.

159. Método, de acordo com a reivindicação 156, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de neoantígenos foi identificada sequenciando-se pelo menos um neoantígeno induzido no indivíduo administrando-se uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

160. Método, de acordo com a reivindicação 155, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um mRNA de neoantígeno codifica uma sequência de neoantígenos induzida colocando-se uma célula neoplásica em contato com uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

161. Método, de acordo com a reivindicação 136, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno e um carreador farmacologicamente aceitável.

162. Método, de acordo com a reivindicação 161, **caracterizado** pelo fato de que o pelo menos um mRNA de neoantígeno é ligado ao carreador farmacologicamente aceitável.

163. Método, de acordo com a reivindicação 161, **caracterizado**

pelo fato de que o carreador farmacologicamente aceitável é selecionado dentre um peptídeo, uma albumina sérica, uma hemocianina de lapa californiana, uma imunoglobulina, uma tiroglobulina, uma ovalbumina, um toxoide ou um derivado de toxoide atenuado, uma citocina e uma quimiocina.

164. Método, de acordo com a reivindicação 136, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno e um diluente farmacologicamente aceitável.

165. Método, de acordo com a reivindicação 136, **caracterizado** pelo fato de que a vacina de neoantígenos compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno e um adjuvante farmacologicamente aceitável.

166. Método, de acordo com a reivindicação 155, **caracterizado** pelo fato de que o mRNA de neoantígeno é encapsulado por um agente de encapsulação.

167. Método, de acordo com a reivindicação 166, **caracterizado** pelo fato de que o agente de encapsulação é um lipossoma.

168. Método, de acordo com a reivindicação 166, **caracterizado** pelo fato de que o agente de encapsulação é uma nanopartícula.

169. Método, de acordo com a reivindicação 160, **caracterizado** pelo fato de que a célula neoplásica está presente em uma cultura celular *in vitro*.

170. Método, de acordo com a reivindicação 160 ou 169, **caracterizado** pelo fato de que a célula neoplásica é obtida do indivíduo.

171. Método, de acordo com a reivindicação 170, **caracterizado** pelo fato de que a célula neoplásica está presente no indivíduo.

172. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 116, **caracterizado** pelo fato de que a pelo menos uma terapia adicional compreende administrar uma citocina ou análogo de citocina.

173. Método, de acordo com a reivindicação 172, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo é intolerante, não responsivo ou pouco responsivo à citocina ou análogo de citocina quando administrada sozinha.

174. Método, de acordo com a reivindicação 172, **caracterizado** pelo fato de que a citocina ou análogo de citocina compreende um intensificador de célula T.

175. Método, de acordo com a reivindicação 172, **caracterizado** pelo fato de que a citocina ou análogo de citocina compreende IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IFN γ e/ou TNF α .

176. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 116, **caracterizado** pelo fato de que a pelo menos uma terapia adicional compreende administrar células T geneticamente modificadas que têm como alvo um tumor.

177. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 176, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 150 mutações ou menos.

178. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 177, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 100 mutações ou menos.

179. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 178, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo tem uma carga mutacional não sinônima de cerca de 50 mutações ou menos.

180. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 179, **caracterizado** pelo fato de que o distúrbio neoplásico é uma malignidade hematológica ou um tumor sólido.

181. Método, de acordo com a reivindicação 180, **caracterizado** pelo fato de que a malignidade hematológica é selecionada dentre uma malignidade de célula B, uma leucemia, um linfoma e um mieloma.

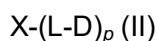
182. Método, de acordo com a reivindicação 180 ou 181, **caracterizado** pelo fato de que a malignidade hematológica é selecionada dentre leucemia mieloide aguda e mieloma múltiplo.

183. Método, de acordo com a reivindicação 180, **caracterizado** pelo fato de que o tumor sólido é selecionado dentre câncer de mama, câncer

gástrico, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer uterino, carcinoma do ducto salivar, melanoma, câncer de cólon e câncer de esôfago.

184. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 183, **caracterizado** pelo fato de que o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, é administrado como parte de um conjugado.

185. Método, de acordo com a reivindicação 184, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado é um conjugado de Fórmula II:



em que

X é um agente de ligação de célula que tem como alvo uma célula neoplásica;

D é o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo;

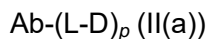
L é um ligante que liga covalentemente X a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15;

186. Método, de acordo com a reivindicação 185, **caracterizado** pelo fato de que o agente de ligação de célula compreende um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

187. Método, de acordo com a reivindicação 185 ou 186, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado é um conjugado de anticorpo-fármaco.

188. Método, de acordo com a reivindicação 187, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado é um conjugado de anticorpo-fármaco de Fórmula II(a):



em que

Ab é um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo que tem como alvo uma célula neoplásica;

D é o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo;

L é um ligante que liga covalentemente Ab a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15;

189. Método, de acordo com a reivindicação 185, **caracterizado** pelo fato de que o agente de ligação de célula compreende um peptídeo.

190. Método, de acordo com a reivindicação 185 ou 189, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado é um conjugado de peptídeo-fármaco.

191. Método, de acordo com a reivindicação 190, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado é um conjugado de peptídeo-fármaco de Fórmula II(b):

$P-(L-D)_p$ (II(b))

em que

P é um peptídeo que tem como alvo uma célula neoplásica;

D é o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo;

L é um ligante que liga covalentemente P a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15;

192. Método, de acordo com a reivindicação 185, **caracterizado** pelo fato de que o agente de ligação de célula compreende um DARPin, um duocorpo, um peptídeo bicíclico, um nanocorpo, uma centrina, MSH (hormônio estimulante de melanócitos), uma molécula de fusão de receptor-Fc, uma estrutura de receptor de célula T, um hormônio esteroide, um fator de crescimento ou um fator estimulante de colônia.

193. Método, de acordo com a reivindicação 185 ou 192, **caracterizado** pelo fato de que o agente de ligação de célula compreende um arcabouço de não anticorpo.

194. Método, de acordo com a reivindicação 193, **caracterizado** pelo fato de que o arcabouço de não anticorpo compreende um arcabouço do

tamanho de um domínio ou um peptídeo restringido.

195. Método, de acordo com a reivindicação 194, **caracterizado** pelo fato de que o arcabouço do tamanho de um domínio é um aficorpo, uma afilina, uma anticalina, um atrímero, um DARPin, um arcabouço FN3, um finômero, um domínio Kunitz, uma pronectina, um corpo em O ou uma proteína de fusão de receptor-Fc.

196. Método, de acordo com a reivindicação 194, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo restringido é um avímero, um peptídeo bicíclico ou um nó Cys.

197. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 185 a 196, **caracterizado** pelo fato de que L é um ligante clivável.

198. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 185 a 196, **caracterizado** pelo fato de que L é um ligante não clivável.

199. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 185 a 198, **caracterizado** pelo fato de que p é um número inteiro de 1 a 10.

200. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 185 a 199, **caracterizado** pelo fato de que p é um número inteiro de 1 a 8.

201. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 185 a 200, **caracterizado** pelo fato de que p é um número inteiro de 1 a 4.

202. Vacina de neoantígenos **caracterizada** pelo fato de que compreende pelo menos um peptídeo de neoantígeno, em que o pelo menos um peptídeo de neoantígeno compreende uma sequência de neoantígenos modificada ou inovadora induzida colocando-se uma célula neoplásica em contato com uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

203. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 202, **caracterizada** pelo fato de que o pelo menos um peptídeo de neoantígeno está na faixa de cerca de 10 a cerca de 35 aminoácidos de comprimento.

204. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 202 ou 203, **caracterizada** pelo fato de que o pelo menos um peptídeo de neoantígeno

está na faixa de cerca de 15 a cerca de 25 aminoácidos de comprimento.

205. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 202, **caracterizada** pelo fato de que compreende adicionalmente um carreador farmacologicamente aceitável.

206. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 205, **caracterizada** pelo fato de que o pelo menos um peptídeo de neoantígeno é ligado ao carreador farmacologicamente aceitável.

207. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 206, **caracterizada** pelo fato de que o carreador farmacologicamente aceitável é selecionado dentre um peptídeo, uma albumina sérica, uma hemocianina de lapa californiana, uma imunoglobulina, uma tiroglobulina, uma ovalbumina, um toxoide ou um derivado de toxoide atenuado, uma citocina e uma quimiocina.

208. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 205, **caracterizada** pelo fato de que o peptídeo de neoantígeno e o carreador farmacologicamente aceitável são covalentemente ligados por meio de um ligante.

209. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 205, **caracterizada** pelo fato de que o peptídeo de neoantígeno e o carreador farmacologicamente aceitável são expressos como uma proteína de fusão.

210. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 202, **caracterizada** pelo fato de que compreende adicionalmente um diluente farmacologicamente aceitável.

211. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 202, **caracterizada** pelo fato de que compreende adicionalmente um adjuvante farmacologicamente aceitável.

212. Vacina de neoantígenos, de acordo com qualquer uma das reivindicações 202 a 204, **caracterizada** pelo fato de que a célula neoplásica está presente em uma cultura celular *in vitro*.

213. Vacina de neoantígenos, de acordo com qualquer uma das reivindicações 202 a 204 ou 212, **caracterizada** pelo fato de que a célula

neoplásica é obtida de um indivíduo.

214. Vacina de neoantígenos, de acordo com qualquer uma das reivindicações 202 a 204, **caracterizada** pelo fato de que a célula neoplásica está presente em um indivíduo.

215. Vacina de neoantígenos **caracterizada** pelo fato de que compreende pelo menos um mRNA de neoantígeno, em que o pelo menos um mRNA de neoantígeno codifica uma sequência de neoantígenos modificada ou inovadora induzida colocando-se uma célula neoplásica em contato com uma quantidade eficaz do Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

216. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 215, **caracterizada** pelo fato de que compreende adicionalmente um carreador farmacologicamente aceitável.

217. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 215, **caracterizada** pelo fato de que o pelo menos um mRNA de neoantígeno é ligado ao carreador farmacologicamente aceitável.

218. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 217, **caracterizada** pelo fato de que o carreador farmacologicamente aceitável é selecionado dentre um peptídeo, uma albumina sérica, uma hemocianina de lapa californiana, uma imunoglobulina, uma tiroglobulina, uma ovalbumina, um toxoide ou um derivado de toxoide atenuado, uma citocina e uma quimiocina.

219. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 215, **caracterizada** pelo fato de que compreende adicionalmente um diluente farmacologicamente aceitável.

220. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 215, **caracterizada** pelo fato de que compreende adicionalmente um adjuvante farmacologicamente aceitável.

221. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 215, **caracterizada** pelo fato de que o mRNA de neoantígeno é encapsulado por um agente de encapsulação.

222. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 221, **caracterizada** pelo fato de que o agente de encapsulação é um lipossoma.

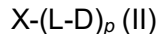
223. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 221, **caracterizada** pelo fato de que o agente de encapsulação é uma nanopartícula.

224. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 215, **caracterizada** pelo fato de que a célula neoplásica está presente em uma cultura celular *in vitro*.

225. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 215 ou 224, **caracterizada** pelo fato de que a célula neoplásica é obtida de um indivíduo.

226. Vacina de neoantígenos, de acordo com a reivindicação 215, **caracterizada** pelo fato de que a célula neoplásica está presente em um indivíduo.

227. Conjugado de Fórmula II:



caracterizado pelo fato de que

X é um agente de ligação de célula que tem como alvo uma célula neoplásica;

D é o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo;

L é um ligante que liga covalentemente X a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15;

228. Conjugado, de acordo com a reivindicação 227, **caracterizado** pelo fato de que o agente de ligação de célula compreende um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

229. Conjugado, de acordo com a reivindicação 227 ou 228, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado é um conjugado de anticorpo-fármaco.

230. Conjugado, de acordo com a reivindicação 229, **caracterizado**

pelo fato de que o conjugado é um conjugado de anticorpo-fármaco de Fórmula II(a):

$Ab-(L-D)_p$ (II(a))

em que

Ab é um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo que tem como alvo uma célula neoplásica;

D é o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo;

L é um ligante que liga covalentemente Ab a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15;

231. Conjugado, de acordo com a reivindicação 227, **caracterizado** pelo fato de que o agente de ligação de célula compreende um peptídeo.

232. Conjugado, de acordo com a reivindicação 227 ou 231, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado é um conjugado de peptídeo-fármaco.

233. Conjugado, de acordo com a reivindicação 232, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado é um conjugado de peptídeo-fármaco de Fórmula II(b):

$P-(L-D)_p$ (II(b))

em que

P é um peptídeo que tem como alvo uma célula neoplásica;

D é o Composto 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo;

L é um ligante que liga covalentemente P a D; e

p é um número inteiro de 1 a 15;

234. Conjugado, de acordo com a reivindicação 227, **caracterizado** pelo fato de que o agente de ligação de célula compreende um DARPin, um duocorpo, um peptídeo bicíclico, um nanocorpo, uma centrina, MSH (hormônio estimulante de melanócitos), uma molécula de fusão de receptor-Fc, uma estrutura de receptor de célula T, um hormônio esteroide, um fator de

crescimento ou um fator estimulante de colônia.

235. Conjugado, de acordo com a reivindicação 227 ou 234, **caracterizado** pelo fato de que o agente de ligação de célula compreende um arcabouço de não anticorpo.

236. Conjugado, de acordo com a reivindicação 235, **caracterizado** pelo fato de que o arcabouço de não anticorpo compreende um arcabouço do tamanho de um domínio ou um peptídeo restringido.

237. Conjugado, de acordo com a reivindicação 236, **caracterizado** pelo fato de que o arcabouço do tamanho de um domínio é um aficorpo, uma afillina, uma anticalina, um atrímero, um DARPin, um arcabouço FN3, um finômero, um domínio Kunitz, uma pronectina, um corpo em O ou uma proteína de fusão de receptor-Fc.

238. Conjugado, de acordo com a reivindicação 236, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo restringido é um avímero, um peptídeo bicíclico ou um nó Cys.

239. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 227 a 238, **caracterizado** pelo fato de que L é um ligante clivável.

240. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 227 a 238, **caracterizado** pelo fato de que L é um ligante não clivável.

241. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 227 a 240, **caracterizado** pelo fato de que p é um número inteiro de 1 a 10.

242. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 227 a 241, **caracterizado** pelo fato de que p é um número inteiro de 1 a 8.

243. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 227 a 242, **caracterizado** pelo fato de que p é um número inteiro de 1 a 4.

FIG. 1A

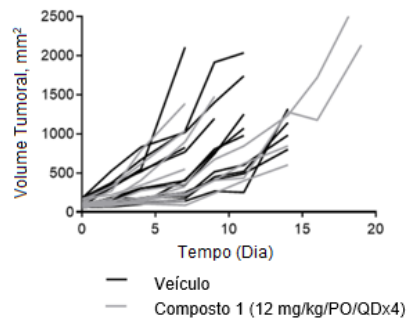


FIG. 1C

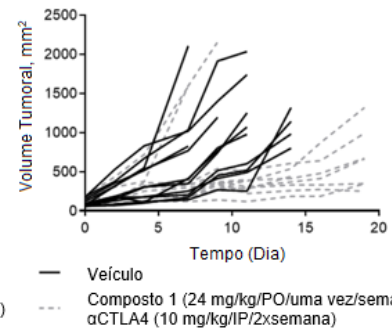
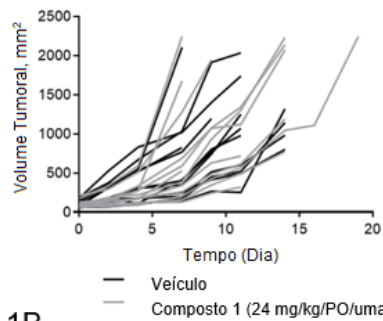
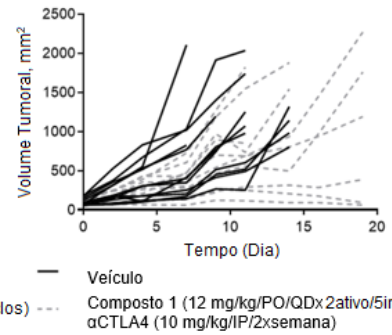
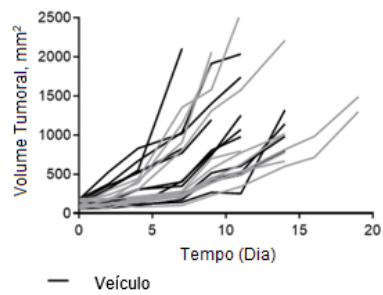
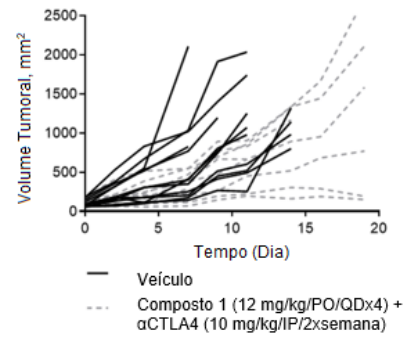
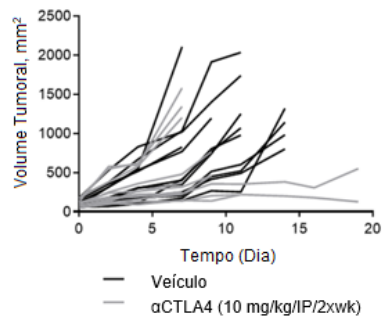


FIG. 1B



RESUMO

“MÉTODOS PARA USAR MODULADORES DE SPLICING”

Esta revelação refere-se a métodos para o tratamento de distúrbios neoplásicos administrando-se o Composto 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, sozinho e/ou como parte de um conjugado ou composição, e induzindo-se a produção de pelo menos um neoantígeno.