



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

(21) BR 112020020759-4 A2



(22) Data do Depósito: 10/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 19/01/2021

(54) **Título:** CONJUGADOS DE FOSFOLIPÍDEOS-FLAVAGLINAS E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO PARA A TERAPIA DIRECIONADA A CÂNCER

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/337; A61K 31/395; A61K 31/537.

(30) **Prioridade Unionista:** 10/04/2018 US 62/655,659.

(71) **Depositante(es):** CELLECTAR BIOSCIENCES, INC..

(72) **Inventor(es):** JARROD LONGCOR.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019026853 de 10/04/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/200017 de 17/10/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 09/10/2020

(57) **Resumo:** CONJUGADOS DE FOSFOLIPÍDEOS-FLAVAGLINAS E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO PARA A TERAPIA DIRECIONADA A CÂNCER . São divulgadas aqui moléculas de éter fosfolipídico (PLE). Além disso, são fornecidos os conjugados de fosfolipídeo-flavagina. O conjugado fosfolipídico-flavagina pode incluir um PLE conjugado a uma flavagina por meio de um ligante. São fornecidos aqui métodos de tratamento de câncer em um sujeito e métodos de direcionamento de um fármaco a um tumor ou célula cancerosa em um sujeito.

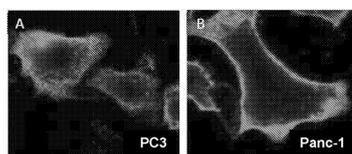


FIG. 1A

FIG. 1B

**CONJUGADOS DE FOSFOLIPÍDEO-FLAVAGLINAS E MÉTODOS DE
USO DOS MESMOS PARA TERAPIA ESPECÍFICA DE CÂNCER**

REFERÊNCIA CRUZADA PARA PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica prioridade ao pedido de patente provisório US No. 62/655,659, depositado em 10 de abril de 2018, o qual é incorporado neste relatório descritivo por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

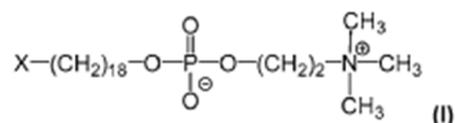
[0002] Esta divulgação se refere a conjugados de fosfolipídeo-flavaglina e terapias direcionadas ao câncer.

INTRODUÇÃO

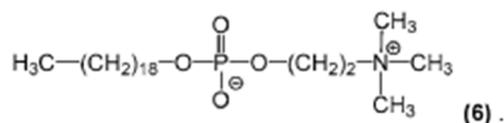
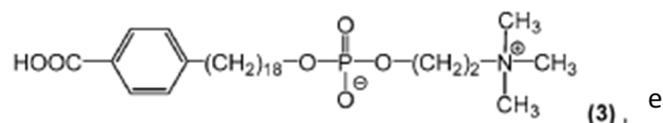
[0003] A maioria dos medicamentos anticâncer em uso clínico tem sua utilidade limitada por sua toxicidade a todas as células em proliferação e/ou pela incapacidade de exercer seu efeito em todas as células tumorais. Novos agentes continuam a ser desenvolvidos com mecanismos de ação únicos destinados a fornecer maior direcionamento, no entanto, muitos desses compostos ainda carecem de seletividade tumoral absoluta e continuam a ser limitados em sua utilização terapêutica devido a efeitos fora do alvo. Conjugados de anticorpo e fármacos (ADCs) foram projetados para se ligarem a epítomos específicos na superfície das células tumorais e ofereceram um método alternativo para direcionar as células tumorais em um esforço para reduzir as toxicidades associadas. Embora altamente seletivos, muito poucos conjugados de anticorpo e fármacos são terapeuticamente úteis, uma vez que somente alcançam uma absorção celular modesta e atividade limitada de morte celular.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0004] Em um aspecto, a divulgação se refere a um éter fosfolipídico (PLE) de acordo com a Fórmula I, ou um sal do mesmo:



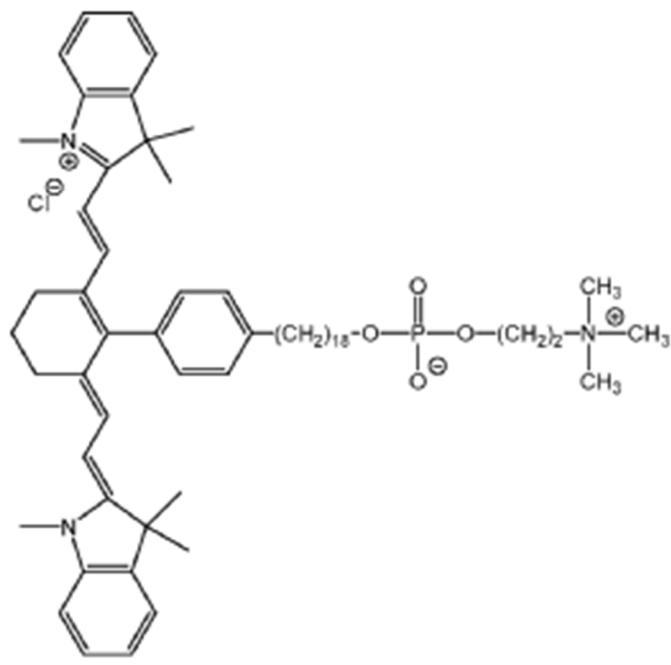
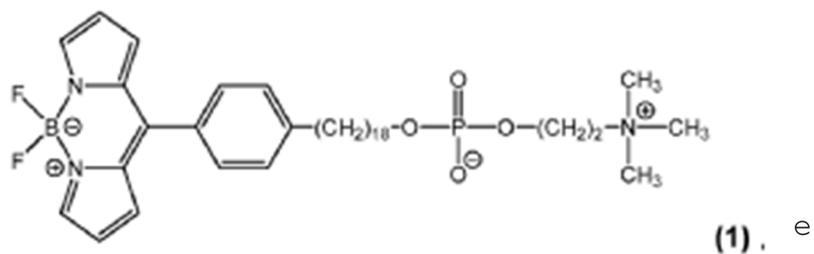
em que X é hidrogênio, metil ou fenil substituído com carboxil. Em algumas concretizações, o PLE é selecionado a partir do seguinte:



Em algumas concretizações, o PLE inclui ainda uma fração detectável anexada ao mesmo.

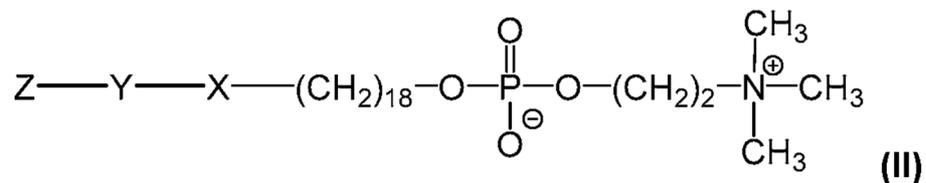
[0005] Em um aspecto adicional, a divulgação se refere a uma composição compreendendo o PLE como detalhado neste relatório descritivo e um transportador.

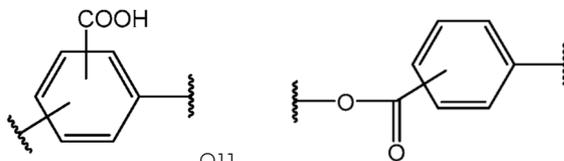
[0006] Outro aspecto da divulgação fornece um composto selecionado a partir do seguinte:

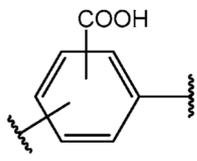
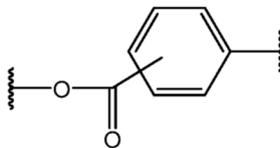


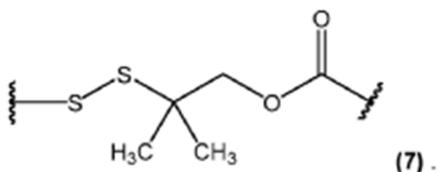
[0006] Outro aspecto da divulgação fornece uma composição compreendendo pelo menos um desses compostos e um transportador.

[0007] Outro aspecto da divulgação fornece um conjugado de acordo com a Fórmula II, ou um sal do mesmo:

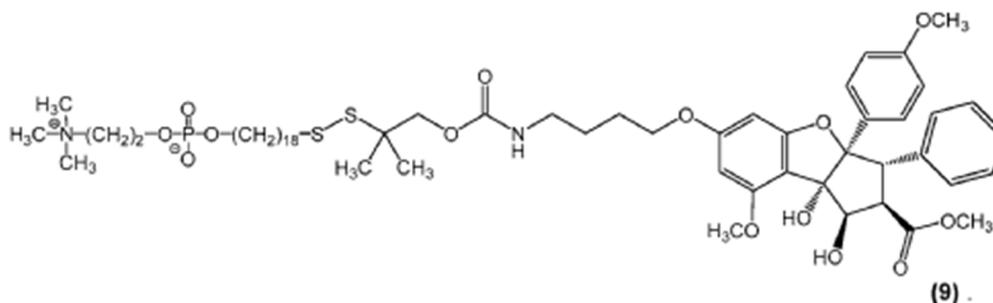
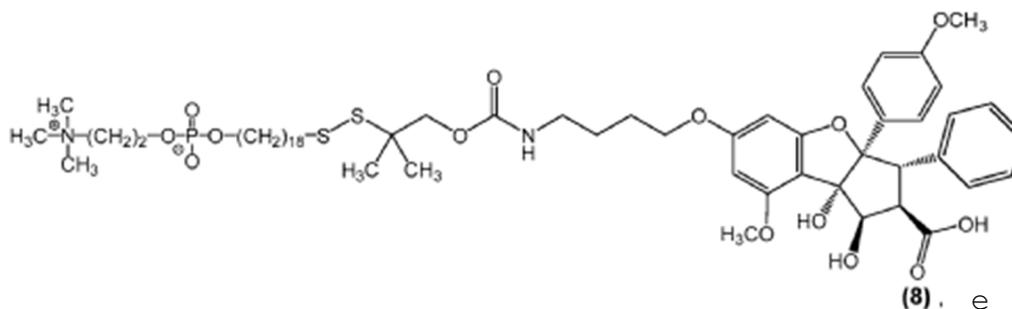




em que X é  ou  ou metileno, ou ligação; Y é um ligante compreendendo um dissulfeto; e Z é um fármaco anticâncer flavaglina. Em algumas concretizações, o fármaco anticâncer flavaglina compreende FLV-1, FLV-3, um derivado ou análogo do mesmo ou uma combinação dos mesmos. Em algumas concretizações, o ligante compreende o seguinte:



[0008] Em algumas concretizações, o conjugado é selecionado a partir do seguinte:



[0009] Outro aspecto da divulgação fornece uma composição compreendendo um conjugado conforme detalhado neste relatório descritivo e um transportador

farmaceuticamente aceitável.

[0009] Outro aspecto da divulgação fornece um método de tratamento de câncer em um sujeito, o método compreendendo a administração ao sujeito de um conjugado conforme detalhado neste relatório descritivo.

[00010] Outro aspecto da divulgação fornece um método para direcionar um fármaco a um tumor ou célula cancerosa em um sujeito, o método compreendendo a administração ao sujeito de um conjugado conforme detalhado neste relatório descritivo.

[00011] Em algumas concretizações, o fármaco anticâncer flavaglina localiza ou viaja para o citoplasma ou organela do tumor ou célula cancerosa. Em algumas concretizações, o conjugado ou fármaco anticâncer de flavaglina é seletivo para células cancerosas no sujeito. Em algumas concretizações, o conjugado ou fármaco anticâncer de flavaglina é incorporado em pelo menos cerca de 2 vezes mais células tumorais ou cancerosas do que células saudáveis. Em algumas concretizações, o câncer é selecionado de melanoma, câncer de cérebro, câncer de pulmão, câncer adrenal, câncer de fígado, câncer renal ou renal, câncer de pâncreas, câncer de esôfago, câncer gástrico, câncer de estômago, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer anal, próstata câncer, câncer de ovário, câncer de mama, câncer cervical, linfoma, leucemia, mieloma, câncer hematológico, hepatocarcinoma, retinoblastoma, glioma, sarcoma, blastoma, carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma. Em algumas concretizações, o sujeito é humano.

[00012] A divulgação fornece outros aspectos e

concretizações que serão evidentes à luz da seguinte descrição detalhada e das figuras anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00013] As FIG. 1A, FIG. 1B, FIG. 1C, FIG. 1D, FIG. 1E são imagens de células tumorais com jangadas lipídicas marcadas. As células tumorais apresentaram maior concentração de jangadas lipídicas em comparação com as células normais. A FIG. 1F é uma imagem de fibroblastos normais e células tumorais Caki-2 com CLR 1501 (composto (1)). CLR 1501 estava altamente localizado em células Caki-2 e minimamente em células fibroblastos normais. A FIG. 1G é uma imagem de células A549 de controle e a FIG. 1H é uma imagem de células A549 tratadas com metil b-ciclodextrina para interromper as jangadas lipídicas. As células em ambas as FIG. 1G e FIG. 1H foram incubados com CLR 1501 (composto (1)), e a ruptura da maioria das jangadas lipídicas em células A549 resultou em 60% de redução na absorção de CLR 1501 (composto (1)). As FIG. 1I, FIG. 1J e FIG. 1K são imagens de células PC3 incubadas com CLR 1501 (composto (1)) e coradas para retículo endoplasmático (ER). CLR 1501 (composto (1)) co-localizado com ER em células malignas, mas não células normais (não mostrado). As FIG. 1L, FIG. 1M e FIG. 1N são imagens de células PC3 incubadas com CLR 1501 (composto (1)) e coradas para o núcleo e mitocôndrias. CLR 1501 (composto (1)) co-localizado com mitocôndrias.

[00014] A FIG. 2 é uma imagem de um camundongo portador de tumor colorretal (HCT-1 16) injetado com CLR 1502 (composto (2)), mostrando a localização do tumor.

[00015] A FIG. 3 é um gráfico de citotoxicidade versus

concentração para um composto citotóxico (FLV1) em comparação com o composto citotóxico conjugado a um PLE (CLR 1865, composto (8)) em células A549 (adenocarcinoma de pulmão humano) ou fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF).

[00016] A FIG. 4 é um gráfico de aumento de vezes em função do tempo para a absorção do conjugado PLE CLR 1852 (composto (9)) em células A375 (melanoma humano) e HEK293 (rim embrionário humano).

[00017] A FIG. 5 são imagens de um modelo de câncer de mama em camundongos, mostrando a absorção *in vivo* de CLR 1502 (composto (2)).

[00018] A FIG. 6 são imagens de linhagens celulares de mieloma, mostrando a absorção de CLR 1501 (composto (1)).

[00019] A FIG. 7 são imagens de células-tronco cancerosas, tecido cerebral normal e células-tronco normais, mostrando a absorção específica de CLR 1501 (composto (1)) nas células cancerosas.

[00020] A FIG. 8 é um gráfico da porcentagem de citotoxicidade versus concentração para CLR 1852 (composto (9)) em comparação com FLV3 em células A549 (adenocarcinoma de pulmão humano) e fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF).

[00021] A FIG. 9 é um gráfico do volume do tumor em função do tempo para o veículo em comparação com CLR 1852 (composto (9)) em um modelo de tumor HCT 116.

[00022] A FIG. 10 é um gráfico do peso corporal em função do tempo para o veículo em comparação com CLR 1852 (composto (9)) em um modelo de tumor HCT 116.

[00023] A FIG. 11 é um gráfico de concentração versus

tempo para FLV3 detectado no citosol (normalizado para o volume citosólico) nas linhagens de células A375 (melanoma humano) e A549 (adenocarcinoma de pulmão humano).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00024] São descritos aqui compostos de fosfolipídios e conjugados de fosfolipídios-flavaglina. Com base em numerosos tumores animais e humanos contendo concentrações de lipídios de éter de ocorrência natural do que os tecidos normais, foram desenvolvidas moléculas de éter de fosfolipídio (PLE). As moléculas de PLE detalhadas neste relatório descritivo podem ser usadas como uma plataforma de direcionamento de tumor para distribuir seletivamente fármacos a tumores e células cancerosas.

[00025] Conforme detalhado aqui, a distribuição de tecido das moléculas de PLE foi examinada em mais de 100 células tumorais diferentes, incluindo amostras de tumor humano fresco. As moléculas de PLE demonstraram captação aumentada no tecido tumoral versus tecido normal. As moléculas de PLE podem ser conjugadas com moléculas de flavaglina e seus derivados por meio de ligantes para formar conjugados de fosfolipídeo-flavaglina.

1. Definições

[00026] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste relatório descritivo têm o mesmo significado como comumente entendido por um técnico versado no assunto. Em caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo as definições, prevalecerá. Métodos e materiais preferidos são descritos abaixo, embora métodos e materiais semelhantes ou

equivalentes aos descritos neste relatório descritivo possam ser usados na prática ou no teste da presente invenção. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes e outras referências aqui mencionadas são incorporadas por referência em sua totalidade. Os materiais, métodos e exemplos divulgados neste relatório descritivo são apenas ilustrativos e não se destinam a ser limitantes.

[00027] Os termos "compreende (m)", "inclui (em)", "tendo", "tem", "pode", "contém" e suas variantes, conforme usadas neste relatório descritivo, pretendem ser frases, termos ou palavras transicionais abertas que não excluem a possibilidade de atos ou estruturas adicionais. As formas singulares "um", "e" e "o" incluem referências no plural, a menos que o contexto dite claramente o contrário. A presente divulgação também contempla outras concretizações "compreendendo", "consistindo em" e "consistindo essencialmente em" ou elementos aqui apresentados, sejam explicitamente estabelecidos ou não.

[00028] Para a recitação de intervalos numéricos neste relatório descritivo, cada número intermediário entre com o mesmo grau de precisão é explicitamente contemplado. Por exemplo, para a faixa de 6-9, os números 7 e 8 são contemplados além de 6 e 9, e para a faixa de 6,0-7,0, o número 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 e 7,0 são explicitamente contemplados.

[00029] O termo "cerca de", conforme usado neste relatório descritivo, aplicado a um ou mais valores de interesse, se refere a um valor que é semelhante a um valor de referência declarado. Em certos aspectos, o termo "cerca

de" se refere a uma faixa de valores que caem dentro de 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ou menos em qualquer direção (maior ou menor que) do valor de referência indicado, a menos que seja indicado de outra forma ou caso contrário, evidente a partir do contexto (exceto onde tal número exceda 100% de um valor possível).

[00030] As definições de grupos funcionais específicos e termos químicos são descritos em mais detalhes abaixo. Para os fins desta descrição, os elementos químicos são identificados de acordo com a Tabela Periódica dos Elementos versão CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed., e os grupos funcionais específicos são em geral definidos como ali descrito. Além disso, os princípios gerais de química orgânica, bem como porções funcionais específicas e reatividade, são descritos em Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith e March's Advanced Organic Chemistry, 7th Edição, John Wiley & Sons, Inc., Nova York, 2013; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., Nova Iorque, 1989; Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3^a edição, Cambridge University Press, Cambridge, 1987; todo o conteúdo de cada um dos quais é incorporado aqui por referência.

[00031] O termo "alcoxi" ou "alcoxil", conforme usado neste relatório descritivo, se refere a um grupo alquil, conforme definido neste relatório descritivo, anexado à fração molecular parental através de um átomo de oxigênio. Exemplos representativos de alcoxi incluem, mas

não estão limitados a metoxi, etoxi, propoxi, 2-propoxi, butoxi e *tert*-butoxi.

[00032] O termo "alquil", conforme usado neste relatório descritivo, significa uma cadeia de hidrocarboneto saturada linear ou ramificada contendo de 1 a 20 átomos de carbono. O termo "alquil inferior" ou "C₁₋₆ alquil" significa um hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada contendo de 1 a 6 átomos de carbono. O termo "C₁₋₄ alquil" significa um hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada contendo de 1 a 4 átomos de carbono. O termo "C₁₋₃ alquil" significa um hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada contendo de 1 a 3 átomos de carbono. Exemplos representativos de alquil incluem, mas não estão limitados a metil, etil, *n*-propil, isopropil, *n*-butil, *sec*-butil, isobutil, *tert*-butil, *n*-pentil, isopentil, neopentil, *n*-hexil, 3-metilhexil, 2,2-dimetilpentil, 2,3-dimetilpentil, *n*-heptil, *n*-octil, *n*-nonil e *n*-decil.

[00033] O termo "alquênil", conforme usado neste relatório descritivo, significa uma cadeia de hidrocarboneto insaturada contendo de 2 a 20 átomos de carbono e pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono.

[00034] O termo "alquinil", conforme usado neste relatório descritivo, significa uma cadeia de hidrocarboneto insaturada contendo de 2 a 20 átomos de carbono e pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono.

[00035] O termo "alcoxialquil", conforme aqui utilizado, se refere a um grupo alcoxi, conforme definido neste relatório descritivo, anexado à fração molecular parental por meio de um grupo alquilenos, conforme definido

neste relatório descritivo.

[00036] O termo "arilalquil", conforme aqui utilizado, se refere a um grupo aril, conforme definido neste relatório descritivo, anexado à fração molecular parental através de um grupo alquileno, conforme definido neste relatório descritivo.

[00037] O termo "alquilamino", conforme usado neste relatório descritivo, significa que pelo menos um grupo alquil, conforme definido neste relatório descritivo, está anexado à fração molecular parental através de um grupo amino, conforme definido neste relatório descritivo.

[00038] O termo "alquileno", tal como aqui utilizado, se refere a um grupo divalente derivado de um hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada de 1 a 10 átomos de carbono, por exemplo, de 2 a 5 átomos de carbono. Exemplos representativos de alquileno incluem, mas não estão limitados a, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, e $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

[00039] O termo "amida", tal como aqui utilizado, significa $-\text{C}(\text{O})\text{NR}-$ ou $-\text{NRC}(\text{O})-$, em que R pode ser hidrogênio, alquil, cicloalquil, aril, heteroaril, heterociclo, alquenil ou heteroalquil.

[00040] O termo "aminoalquil", conforme usado neste relatório descritivo, significa que pelo menos um grupo amino, conforme definido neste relatório descritivo, está anexado à fração molecular parental através de um grupo alquileno, conforme definido neste relatório descritivo.

[00041] O termo "amino" tal como aqui usado, significa $-\text{NR}_x\text{R}_y$, em que R_x e R_y pode ser hidrogênio, alquil,

cicloalquil, aril, heteroaril, heterociclo, alquenil ou heteroalquil. No caso de um grupo aminoalquil ou qualquer outra fração onde amino anexa duas outras frações, amino pode ser $-NR_x-$, em que R_x pode ser hidrogênio, alquil, cicloalquil, aril, heteroaril, heterociclo, alquenil ou heteroalquil.

[00042] O termo "aril", conforme usado neste relatório descritivo, se refere a um grupo aromático, tal como um grupo fenil ou um sistema de anel fundido bicíclico. Sistemas de anéis bicíclicos fundidos são exemplificados por um grupo fenil anexado à fração molecular parental e fundido a um grupo cicloalquil, como definido neste relatório descritivo, um grupo fenil, um grupo heteroaril, como definido neste relatório descritivo, ou um heterociclo, como definido neste relatório descritivo. Exemplos representativos de aril incluem, mas não estão limitados a, indolil, naftil, fenil, quinolinil e tetra-hidroquinolinil. "Arilalquil" se refere a um alquil, conforme definido neste relatório descritivo, substituído por um radical aril.

[00043] "Arileno" se refere a um aril conforme definido neste relatório descritivo, tendo dois centros radicais monovalentes derivados pela remoção de dois átomos de hidrogênio de dois átomos de carbono diferentes de um aril parental. Os radicais arileno típicos incluem, mas não estão limitados a, fenileno e naftileno. "Arilalquileno" se refere a um arilalquil conforme definido neste relatório descritivo tendo dois centros de radicais monovalentes derivados pela remoção de um átomo de hidrogênio do radical aril e o outro hidrogênio removido do radical alquil do grupo.

[00044] O termo "carboxil", conforme usado neste relatório descritivo, significa um ácido carboxílico ou -COOH.

[00045] O termo "cicloalquil" significa um anel de hidrocarboneto saturado monovalente ou um grupo bicíclico. Os grupos cicloalquil têm zero heteroátomos e zero ligações duplas.

Os grupos cicloalquil são monocíclicos ou sistemas de anéis fundidos, espiro ou bicíclicos em ponte. Os grupos cicloalquil monocíclicos contêm de 3 a 10 átomos de carbono, de preferência de 4 a 7 átomos de carbono, e mais preferencialmente de 5 a 6 átomos de carbono no anel. Os grupos cicloalquil bicíclicos contêm 8 a 12 átomos de carbono, de preferência 9 a 10 átomos de carbono no anel. Os grupos cicloalquil podem ser substituídos ou não substituídos. Os grupos cicloalquil incluem, por exemplo, ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, ciclohexil e cicloheptil.

[00046] O termo "cicloalquenil", tal como aqui utilizado, significa um sistema de anel monocíclico ou multicíclico não aromático contendo pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono e de preferência tendo de 5-10 átomos de carbono por anel. Anéis de cicloalcenil monocíclicos exemplares incluem ciclopentenil, ciclohexenil e cicloheptenil.

[00047] O termo "cicloalquinil", tal como aqui utilizado, significa um sistema de anel monocíclico ou multicíclico contendo pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono e de preferência tendo de 5-10 átomos de carbono por

anel ou mais de 10 átomos de carbono por anel.

[00048] O termo "haloalquil", conforme usado neste relatório descritivo, significa um grupo alquil, conforme definido neste relatório descritivo, em que um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete ou oito átomos de hidrogênio são substituídos por um halogênio. Exemplos representativos de haloalquil incluem, mas não estão limitados a, 2-fluoroetil, 2,2,2-trifluoroetil, trifluorometil, difluorometil, pentafluoroetil e trifluoropropil, tal como 3,3,3-trifluoropropil.

[00049] O termo "halogênio" ou "halo", conforme usado neste relatório descritivo, significa Cl, Br, I ou F.

[00050] O termo "heteroalquil", tal como aqui utilizado, significa um grupo alquil, conforme definido neste relatório descritivo, em que pelo menos um dos carbonos do grupo alquil é substituído por um heteroátomo, tal como oxigênio, nitrogênio e enxofre. Exemplos representativos de heteroalquilos incluem, mas não estão limitados a alquil éteres, alquil aminas secundárias e terciárias, amidas e sulfetos de alquil.

[00051] O termo "heteroaril", tal como aqui utilizado, se refere a um anel monocíclico aromático ou um sistema de anel bicíclico aromático contendo pelo menos um heteroátomo independentemente selecionado do grupo que consiste em N, O e S. Os anéis monocíclicos aromáticos são cinco ou anéis de seis membros contendo pelo menos um heteroátomo independentemente selecionado do grupo que consiste em N, O e S. Os anéis monocíclicos aromáticos de cinco membros têm duas ligações duplas e os anéis monocíclicos aromáticos de

seis membros de seis membros têm três ligações duplas. Os grupos heteroaril bicíclicos são exemplificados por um anel heteroaril monocíclico anexado à fração molecular parental e fundido a um grupo cicloalquil monocíclico, como aqui definido, um grupo aril monocíclico, como aqui definido, um grupo heteroaril monocíclico, como aqui definido, ou um grupo monocíclico heterociclo, conforme definido aqui.

[00052] O termo "heterociclo" ou "heterocíclico" ou "heterociclil", tal como aqui utilizado, significa um heterociclo monocíclico, um heterociclo bicíclico (heterobicíclico) ou um heterociclo tricíclico. O heterociclo monocíclico é um anel de três, quatro, cinco, seis, sete ou oito membros contendo pelo menos um heteroátomo selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em O, N e S. O anel de três ou quatro membros contém zero ou uma ligação dupla e um heteroátomo selecionado do grupo que consiste em O, N e S. O anel de cinco membros contém zero ou uma ligação dupla e um, dois ou três heteroátomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S. O anel de seis membros contém zero, uma ou duas ligações duplas e um, dois ou três heteroátomos selecionados do grupo que consiste em O, N, e S. Os anéis de sete e oito membros contém zero, um, dois ou três ligações duplas e um, dois ou três heteroátomos selecionados do grupo que consiste em O, N e S. Exemplos representativos de heterociclos monocíclicos incluem, mas não estão limitados a, azetidil, azepanil, aziridinil, diazepanil, 1,3-dioxanil, 1,3-dioxolanil, 1,3-ditiolanil, 1,3-ditianil, imidazolinil, imidazolidinil, isotiazolinil, isotiazolidinil, isoxazolinil,

isoxazolidinil, morfolinil, oxadiazolinil, oxadiazolidinil, oxazolinil, oxazolidinil, oxetanil, piperazinil, piperidinil, piranil, pirazolinil, pirazolidinil, pirrolinil, pirrolidinil, tetra-hidrofuranil, tetra-hidropiranil, tetra-hidropiridinil, tetra-hidrotienil, tiadiazolinil, tiadiazolidinil, 1, 2-thiazinanil, 1,3-thiazinanil, tiazolinil, tiazolidinil, tiomorfolinil, 1,1-dioxidotiomorfolinil (tiomorfolina sulfona), tiopiranil e tritianil. O heterociclo bicíclico é um heterociclo monocíclico fundido a um grupo fenil, ou um heterociclo monocíclico fundido a um cicloalquil monocíclico, ou um heterociclo monocíclico fundido a um cicloalquenil monocíclico, ou um heterociclo monocíclico fundido a um heterociclo monocíclico heterociclo, ou um sistema de anel heterocíclico monocíclico em que dois átomos não adjacentes do anel estão ligados por uma ponte de alquileno de 1, 2, 3 ou 4 átomos de carbono, ou uma ponte de alquenileno de dois, três ou quatro átomos de carbono. Exemplos representativos de heterociclos bicíclicos incluem, mas não estão limitados a benzopiranil, octahidrociclopenta [c] pirrolil, octahidropirrolopiridinil e tetrahidroisoquinolinil. Os heterociclos tricíclicos são exemplificados por um heterociclo bicíclico fundido a um grupo fenil, ou um heterociclo bicíclico fundido a um cicloalquil monocíclico, ou um heterociclo bicíclico fundido a um cicloalcenil monocíclico, ou um heterociclo bicíclico fundido a um heterociclo monocíclico, ou um heterociclo monocíclico em que dois átomos não adjacentes do anel bicíclico estão ligados por uma ponte alquileno de 1, 2, 3 ou 4 átomos de

carbono, ou uma ponte alquênico de dois, três ou quatro átomos de carbono. Exemplos de heterociclos tricíclicos incluem, mas não se limitam a, octahidro-2,5-epoxipentaleno, hexahidro-2*H*-2,5-metanociclopenta[*b*]furan, hexahidro-1*H*-1,4-metanociclopenta[*c*]furan, aza-adamantane (1-azatriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano) e oxa-adamantane (2-oxatriciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano). Os heterociclos monocíclicos, bicíclicos e tricíclicos são conectados à fração molecular parental através de qualquer átomo de carbono ou qualquer átomo de nitrogênio contido nos anéis e podem ser não substituídos ou substituídos.

[00053] O termo "heteroarilalquil", conforme aqui utilizado, se refere a um grupo heteroaril, conforme definido neste relatório descritivo, anexado à fração molecular parental através de um grupo alquênico, conforme definido neste relatório descritivo.

[00054] O termo "heterociclilalquil", tal como aqui utilizado, se refere a um grupo heterociclo, como aqui definido, anexado à fração molecular parental através de um grupo alquênico, como aqui definido.

[00055] O termo "hidroxil" ou "hidroxi", conforme usado neste relatório descritivo, significa um grupo -OH.

[00056] O termo "hidroxialquil", tal como aqui utilizado, significa que pelo menos um grupo -OH está anexado à fração molecular parental através de um grupo alquênico, conforme definido neste relatório descritivo.

[00057] Em alguns casos, o número de átomos de carbono em um substituinte de hidrocarbônio (por exemplo, alquil ou cicloalquil) é indicado pelo prefixo "C_{x-y}", em que *x* é o

mínimo e y é o número máximo de átomos de carbono no substituinte. Assim, por exemplo, "alquil C1-3" se refere a um substituinte alquil contendo de 1 a 3 átomos de carbono.

[00058] O termo "substituído" se refere a um grupo que pode ainda ser substituído por um ou mais grupos substituintes não hidrogênio. Os grupos substituintes incluem, mas não estão limitados a, halogênio, = O (oxo), = S (tioxo), ciano, nitro, fluoroalquil, alcoxilfluoroalquil, fluoroalcoxi, alquil, alquenil, alquinil, haloalquil, haloalcoxi, heteroalquil, cicloalquil, cicloalquenil, aril, heteroaril, heterociclo, cicloalquilalquil, heteroarilalquil, arilalquil, hidroxil, hidroxialquil, alcoxi, alcoxilalquil, alquilenil, ariloxil, fenoxil, benziloxil, amino, alquilamino, acilamino, aminoalquil, arilamino, sulfonilamino, sulfonilamino, sulfonilamino, sulfonilamino, sulfonilamino, sulfonilamino sulfinil, -COOH, cetona, amida, carbamato e acil.

[00059] O termo "z" designa uma ligação simples (-) ou uma ligação dupla (=) ou uma ligação tripla

[00060] Para os compostos descritos neste relatório descritivo, os grupos e substituintes dos mesmos podem ser selecionados de acordo com a valência permitida dos átomos e dos substituintes, de modo que as seleções e substituições resultem em um composto estável, por exemplo, que não sofre transformação espontânea, tal como por rearranjo, ciclização, eliminação, etc.

[00061] O termo "administração" ou "administração", tal como aqui utilizado, se refere a fornecer, contatar e / ou entrega de um composto ou conjugado por qualquer via

apropriada para atingir o efeito desejado. Estes compostos ou conjugados podem ser administrados a um sujeito de várias maneiras, incluindo, mas não se limitando a, oral, ocular, nasal, intravenosa, topicamente, como aerossóis, supositórios, etc. e podem ser usados em combinação.

[00062] Conforme usado neste relatório descritivo, "câncer" pode incluir qualquer célula ou tecido derivado de um tumor, neoplasia, câncer, pré-câncer, linha celular, malignidade ou qualquer outra fonte de células que têm o potencial de se expandir e crescer a um grau ilimitado. As células cancerosas podem ser derivadas de fontes de ocorrência natural ou podem ser criadas artificialmente. As células cancerosas também podem ser capazes de invasão em outros tecidos e metástase. As células cancerosas abrangem ainda quaisquer células malignas que invadiram outros tecidos e / ou metastatizaram. Uma ou mais células cancerosas no contexto de um organismo também podem ser chamadas de câncer, tumor, neoplasia, crescimento, malignidade ou qualquer outro termo usado na técnica para descrever células em um estado canceroso. O câncer pode incluir, por exemplo, melanoma, câncer cerebral, câncer de pulmão, câncer adrenal, câncer de fígado, câncer renal ou câncer de rim, câncer de pâncreas, câncer de esôfago, câncer gástrico, câncer de estômago, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer anal, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de mama, câncer cervical, linfoma, leucemia, mieloma, câncer hematológico, hepatocarcinoma, retinoblastoma, glioma, sarcoma, blastoma, carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma.

[00063] Os termos "controle", "nível de referência" e

"referência" são usados aqui de forma intercambiável. O nível de referência pode ser um valor ou intervalo predeterminado, que é empregado como uma referência contra a qual avaliar o resultado medido. "Grupo de controle", conforme usado neste documento, refere-se a um grupo de sujeitos de controle. O nível predeterminado pode ser um valor de corte de um grupo de controle. O nível predeterminado pode ser uma média de um grupo de controle. Os valores de corte (ou valores de corte predeterminados) podem ser determinados pela metodologia Adaptive Index Model (AIM). Os valores de corte (ou valores de corte predeterminados) podem ser determinados por uma análise de curva operacional do receptor (ROC) de amostras biológicas do grupo de pacientes. A análise ROC, como geralmente conhecida nas artes biológicas, é uma determinação da capacidade de um teste de discriminar uma condição da outra. Uma descrição da análise ROC é fornecida em P.J. Heagerty et al. (Biometrics 2000, 56, 337-44), cuja divulgação é aqui incorporada por referência em sua totalidade. Alternativamente, os valores de corte podem ser determinados por uma análise de quartil de amostras biológicas de um grupo de pacientes. Por exemplo, um valor de corte pode ser determinado selecionando um valor que corresponda a qualquer valor no intervalo do 25°-75° percentil, de preferência um valor que corresponda ao 25° percentil, o 50° percentil ou o 75° percentil, e mais preferencialmente o 75° percentil. Tais análises estatísticas podem ser realizadas usando qualquer método conhecido na técnica e podem ser implementadas por meio de qualquer número de pacotes de *software* disponíveis

comercialmente (por exemplo, da Analyze-it Software Ltd., Leeds, Reino Unido; StataCorp LP, College Station, TX; SAS Institute Inc., Cary, NC.). Os níveis ou intervalos saudáveis ou normais para um alvo ou para uma atividade de proteína podem ser definidos de acordo com a prática padrão. Um controle pode ser um sujeito, ou uma amostra dele, cujo estado de doença é conhecido. O sujeito, ou amostra do mesmo, pode ser saudável, doente, doente antes do tratamento, doente durante o tratamento, doente após o tratamento ou saudável após o tratamento ou uma combinação dos mesmos. O termo "sujeito normal", tal como aqui utilizado, significa um sujeito saudável, ou seja, um sujeito sem sinais ou sintomas clínicos de doença. O indivíduo normal é avaliado clinicamente para sinais ou sintomas de doença não detectados, cuja avaliação pode incluir exame físico de rotina e / ou testes laboratoriais. Em algumas modalidades, o controle é um controle saudável. Em algumas modalidades, o controle compreende câncer.

[00064] O termo "dosagem eficaz" ou "dosagem terapêutica" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" ou "quantidade eficaz", conforme usado neste relatório descritivo, significa uma quantidade suficiente para desencadear um efeito terapêutico ou uma dosagem de um medicamento eficaz por períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado terapêutico desejado. Uma dosagem eficaz pode ser determinada por um versado na técnica e pode variar de acordo com fatores como o estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo, a forma de administração, o estágio e a gravidade da doença, o estado geral estado de saúde do

sujeito, o julgamento do médico prescritor e a capacidade do medicamento de provocar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também aquela em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais da substância são superados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para atingir o resultado profilático desejado. Normalmente, 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.

[00065] Os termos "inibir" ou "inibição" significam que uma atividade é diminuída ou evitada na presença de um inibidor, em oposição à ausência do inibidor. O termo "inibição" se refere à redução ou regulação negativa de um processo ou à eliminação de um estímulo para um processo, que resulta na ausência ou minimização da expressão ou atividade de um biomarcador ou polipeptídeo. A inibição pode ser direta ou indireta. A inibição pode ser específica, ou seja, o inibidor inibe um biomarcador ou polipeptídeo e não outros.

[00066] "Amostra" ou "amostra de teste", conforme usado neste relatório descritivo, pode significar qualquer amostra na qual a presença e / ou nível de composto ou alvo deve ser detectado ou determinado. As amostras podem incluir líquidos, soluções, emulsões, misturas ou suspensões. As amostras podem incluir uma amostra médica. As amostras podem incluir qualquer fluido ou tecido biológico, como sangue,

sangue total, frações de sangue, como plasma e soro, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), músculo, fluido intersticial, suor, saliva, urina, lágrimas, fluido sinovial, osso medula, líquido cefalorraquidiano, secreções nasais, expectoração, líquido amniótico, líquido de lavagem broncoalveolar, lavagem gástrica, êmese, matéria fecal, tecido pulmonar, células mononucleares de sangue periférico, glóbulos brancos totais, células de nódulos linfáticos, células do baço, células da amígdala, células cancerosas, células tumorais, bile, fluido digestivo, pele ou combinações dos mesmos. Em algumas concretizações, a amostra compreende uma alíquota. Em outras concretizações, a amostra compreende um fluido biológico. As amostras podem ser obtidas por qualquer meio conhecido na técnica. A amostra pode ser usada diretamente conforme obtida de um paciente ou pode ser pré-tratada, tal como por filtração, destilação, extração, concentração, centrifugação, inativação de componentes interferentes, adição de reagentes e semelhantes, para modificar o caráter do amostra de alguma maneira como aqui discutido ou de outra forma como é conhecido no estado da técnica. As amostras podem ser obtidas antes do diagnóstico, antes do tratamento, durante o tratamento, após o tratamento ou após o diagnóstico, ou uma combinação dos mesmos.

[00067] O termo "especificidade", conforme usado neste relatório descritivo, se refere ao número de verdadeiros negativos dividido pelo número de verdadeiros negativos mais o número de falsos positivos, onde a especificidade ("especificação") pode estar dentro do intervalo de 0

<especificação <1. Portanto, um método que tem sensibilidade e especificidade igual a um, ou 100%, é preferido.

[00068] Por "liga-se especificamente", geralmente significa que um composto ou conjugado se liga a um alvo quando se liga a esse alvo mais prontamente do que se ligaria a um alvo aleatório não relacionado.

[00069] "Sujeito", conforme usado neste relatório descritivo, pode significar um mamífero que deseja ou precisa dos compostos ou métodos descritos neste relatório descritivo. O sujeito pode ser um ser humano ou um animal não humano. O sujeito pode ser um mamífero. O mamífero pode ser um primata ou não primata. O mamífero pode ser um primata, como um ser humano; um não primata como, por exemplo, cão, gato, cavalo, vaca, porco, camundongo, rato, camelo, lama, cabra, coelho, ovelha, hamster e porquinho da índia; ou primatas não humanos como, por exemplo, macaco, chimpanzé, gorila, orangotango e gibão. O sujeito pode ser de qualquer idade ou estágio de desenvolvimento, como, por exemplo, um adulto, um adolescente ou uma criança. O sujeito pode ser homem ou mulher. Em algumas concretizações, o sujeito tem um marcador genético específico.

[00070] Conforme usado neste relatório descritivo, o termo "tóxico" se refere a uma quantidade de uma entidade química, agente ou substância que seria prejudicial ao sujeito ou causaria qualquer efeito adverso. O termo "não tóxico" se refere a uma substância que tem um grau relativamente baixo no qual pode causar danos a um sujeito. "Citotóxico" se refere a uma entidade química, agente ou substância que é tóxica para as células. Toxicidade

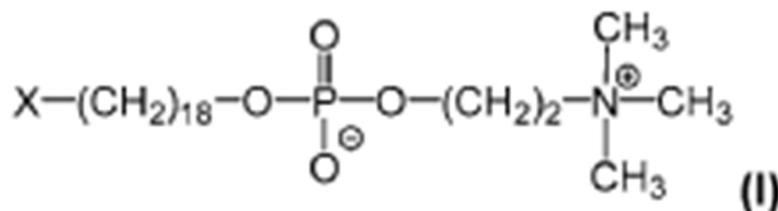
pode se referir ao efeito em um organismo inteiro, como um animal, bactéria, planta ou outro sujeito, conforme definido neste relatório descritivo, bem como o efeito em uma subestrutura do organismo, como uma célula (citotoxicidade) ou um órgão (organotoxicidade), como o fígado (hepatotoxicidade). Um conceito central da toxicologia é que os efeitos são dependentes da dose; até mesmo a água pode levar à intoxicação por água quando tomada em doses grandes o suficiente, ao passo que mesmo para uma substância muito tóxica, como o veneno de cobra, há uma dose abaixo da qual não há efeito tóxico detectável. Uma composição ou composto que é relativamente não tóxico pode permitir que uma gama mais ampla de sujeitos seja capaz de manusear com segurança a composição ou composto, sem sérias preocupações ou riscos de segurança.

[00071] Os termos "tratar", "tratado" ou "tratando", como usados neste documento, referem-se a um agente terapêutico em que o objetivo é retardar (diminuir) uma condição fisiológica indesejada, distúrbio ou doença, ou para obter uma clínica benéfica ou desejada resultados. Para os fins desta invenção, os resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não estão limitados a, alívio dos sintomas; diminuição da extensão da condição, distúrbio ou doença; estabilização (isto é, não agravamento) do estado da condição, distúrbio ou doença; atraso no início ou desaceleração da progressão da condição, distúrbio ou doença; melhoria da condição, distúrbio ou estado de doença; e remissão (seja parcial ou total), seja detectável ou indetectável, ou aumento ou melhora da condição, distúrbio

ou doença. O tratamento também inclui o prolongamento da sobrevida em comparação à sobrevida esperada se não houver tratamento. "Tratamento" ou "tratar", quando se refere à proteção de um sujeito de uma doença, significa suprimir, reprimir, melhorar ou eliminar completamente a doença. A prevenção da doença envolve a administração de uma composição da presente invenção a um sujeito antes do início da doença. A supressão da doença envolve a administração de uma composição da presente invenção a um sujeito após a indução da doença, mas antes do seu aparecimento clínico. Reprimir ou melhorar a doença envolve a administração de uma composição da presente invenção a um sujeito após o aparecimento clínico da doença. A doença pode compreender câncer.

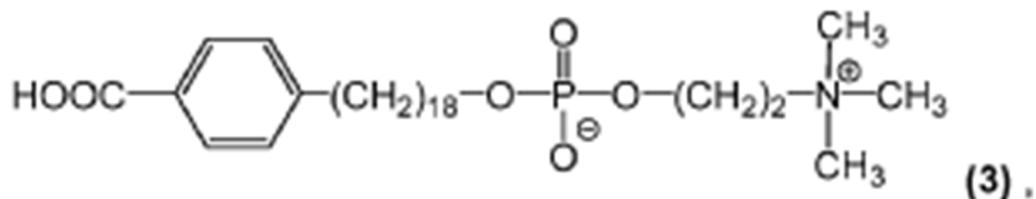
2. Éteres fosfolipídicos

[00072] São fornecidas aqui moléculas de éter fosfolipídico (PLE). O PLE pode estar de acordo com a Fórmula I, ou um sal do mesmo:

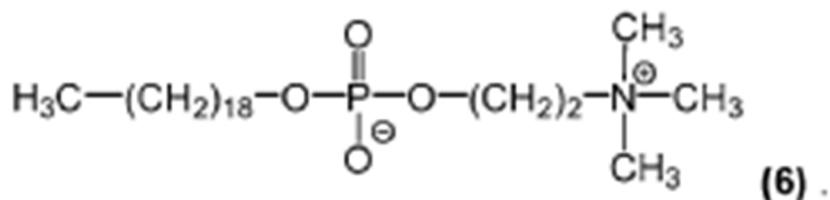


em que X é hidrogênio, metil ou fenil substituído com carboxil.

[00073] Em algumas concretizações, o PLE é selecionado a partir do seguinte:



e



[00074] O PLE pode ser conjugado a uma fração detectável (também referida como um repórter ou um marcador), tal como, por exemplo, uma molécula fluorescente, molécula quimoluminescente, radiomarcador, marcador magnético, molécula infravermelha ou uma combinação dos mesmos. Rótulos magnéticos são frações de rotulagem que, quando suficientemente associadas a um sensor de proximidade magnética, são detectáveis pelo sensor de proximidade magnética e fazem com que o sensor de proximidade magnética emita um sinal. As etiquetas magnéticas podem incluir um ou mais materiais selecionados a partir de materiais paramagnéticos, superparamagnéticos, ferromagnéticos, anti-ferromagnéticos, combinações dos mesmos e semelhantes. Os rótulos fluorescentes são porções de rotulagem que são detectáveis por um detector de fluorescência. As moléculas fluorescentes adequadas (fluoróforos) incluem, mas não estão limitadas a, fluoresceína, diclorotriazina, carboxifluoresceína-alanina-carboxamida enjaulada, Oregon Green 488, Oregon Green 514; Lucifer Yellow, acridina Orange, rodamina, tetrametilrodamina, Texas Red, iodeto de propídio, JC-1

(5,5',6,6'-tetracloro-1,3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbo cianina iodeto), tetrabromorodamina 123, rodamina 6G , TMRM (éster metílico de tetrametil rodamina), TMRE (éster etílico de tetrametil rodamina), tetrametilrosamina, rodamina B e 4-dimetilaminotetrametilrosamina, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente verde deslocada para azul, proteína fluorescente verde deslocada para o ciano , proteína fluorescente verde desviada para amarelo, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-dissulfônico; acridina e derivados, tais como acridina, isotiocianato de acridina; 5-(2' ácido -aminoetil) aminonaftaleno-1-sulfônico (EDANS); Disulfonato de 4-amino-N-[3-vinilsulfonil) fenil] naft-alimida-3,5; N-(4-anilino-1-naftil) maleimida; antranilamida; Ácido 4,4-difluor-5-(2-tienil) -4-bora-3a, 4a diaza-5-indaceno-3-propioni-c BODIPY; cascata blue; Amarelo brilhante; cumarina e derivados: cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Coumarin 120), 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Coumarin 151); corantes de cianina; cianossina; 4', 6-diaminidino-2-fenilindole (DAPI); 5', 5''-dibromopirogalol-sulfonaftaleína (Vermelho de bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil) -4-metilcumarina; pentaacetato de dietilenetriaamina; 4,4'-diisotiocianatodi-dihidro-estilbeno-2- ácido; ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-dissulfônico; cloreto de 5-(dimetilamino) naftaleno-1-sulfonil (DNS, dansilcloreto); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina e derivados: eosina, isotiocianato de eosina, eritrosina e derivados: eritrosina B, eritrosina,

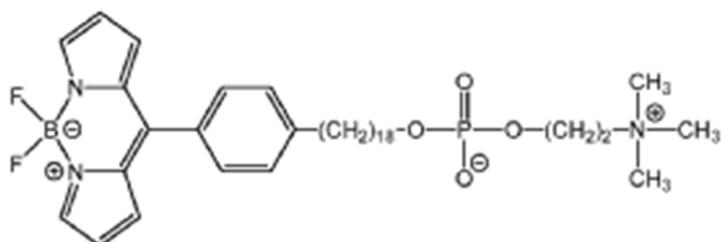
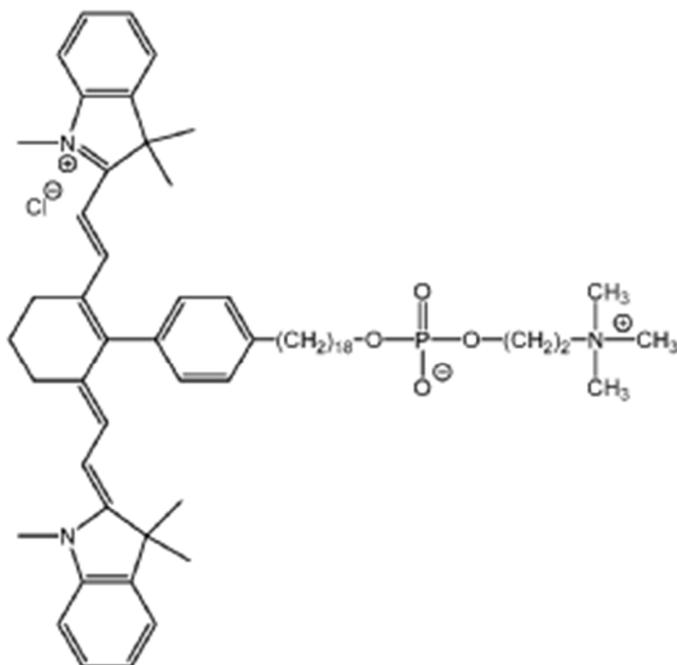
isotiocianato; etídio; fluoresceína e derivados: 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il) amino-1 -fluoresceína (DTAF), 2', 7' dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, QFITC, (XRITC); fluorescamina; IR144; IR1446; Isotiocianato de verde malaquita; 4-metilumbelli-feroneortho cresolftaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Vermelho de fenol; B-ficoeritrina; o-ftaldialdeído; pireno e derivados: fluoresceína e derivados: 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il) amino-1 -fluoresceína (DTAF), 2', 7' dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, QFITC, (XRITC); fluorescamina; IR144; IR1446; Isotiocianato de verde malaquita; 4-metilumbelli-feroneortho cresolftaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Vermelho de fenol; B-ficoeritrina; o-ftaldialdeído; pireno e derivados: fluoresceína e derivados: 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il) amino-1 -fluoresceína (DTAF), 2', 7' dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, QFITC, (XRITC); fluorescamina; IR144; IR1446; Isotiocianato de verde malaquita; 4-metilumbelli-feroneortho cresolftaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Vermelho de fenol; B-ficoeritrina; o-ftaldialdeído; pireno e derivados: o-ftaldialdeído; pireno e derivados: o-ftaldialdeído; pireno e derivados: pireno, butirato de pireno, succinimidil 1 -pireno; pontos quânticos de butirato; Reativo vermelho 4 (Cibacron™ Brilliant Red 3B-

A) rodamina e derivados: 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxyrhodamina (R6G), lissamina rodamina B sulfonil cloreto rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulforhodamina B,

sulforhodamina 101, cloreto de sulfonilo derivado de sulforhodamina 101 (Texas Red);

N, N, N ', N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA); tetrametil rodamina; isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; Ácido 5- (2'-aminoetil) aminonaftaleno-1-sulfônico (EDANS), ácido 4- (4'-dimetilaminofenilazo) benzóico (DABCYL), ácido rosólico; CAL Fluor Orange 560; derivados de quelato de térbio; Cy 3; Cy 5; Cy 5.5; Cy 7; IRD 700; IRD 800; La Jolla Blue; ftalocianina; e naftalocianina, cumarinas e corantes relacionados, corantes de xanteno, tais como rodóis, resorufinas, bimanos, acridinas, isoindoles, corantes dansil, hidrazidas aminoftálicas, tais como luminol, e derivados de isoluminol, aminoftalimidias, aminonapquinolimidias, aminonafquinolimidias, aminonapquinolimidias, aminonapquinolansftalimidias, aminonapquinolansftalimidias e eurocentinocenteno-complexos; combinações dos mesmos e semelhantes.

[00075] A porção detectável pode ser covalentemente ou clivável ligada ao PLE. Por exemplo, o PLE marcado pode ser selecionado a partir do seguinte:

**CLR 1501 (1) . e****CLR 1502 (2) .**

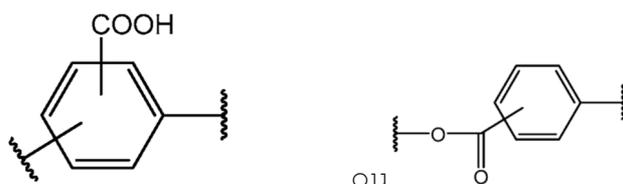
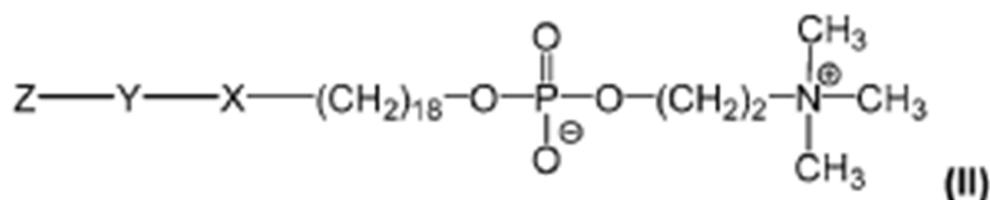
[00076] O composto (1) acima é PLE (3) com a fração fluorescente, BODIPY, estavelmente ligada ao PLE, e também pode ser referido como CLR 1501. O composto (2) acima é PLE (3) com uma molécula de infravermelho próximo, IR-775, estavelmente ligada ao PLE, e também pode ser referida como CLR 1502. Os compostos (1) e (2) também podem ser referidos como um conjugado de fármaco fosfolipídica (PDC).

[00077] O PLE, ou um conjugado do mesmo, pode ser específico para um tumor ou célula cancerosa. Após a administração a um sujeito, o PLE, ou um conjugado do mesmo, pode se localizar em um tumor ou célula cancerosa. O PLE, ou um conjugado do mesmo, pode ser incorporado em um tumor ou célula cancerosa mais do que uma célula saudável. O PLE, ou

um conjugado do mesmo, pode ser incorporado em pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 6 vezes, pelo menos cerca de 7 vezes, pelo menos cerca de 8 vezes, pelo menos cerca de 9 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, pelo menos cerca de 15 vezes, pelo menos cerca de 20 vezes, pelo menos cerca de 25 vezes, pelo menos cerca de 30 - vezes mais células tumorais ou cancerosas do que células saudáveis.

3. Conjugados Fosfolipídio-Flavaglina

[00078] Um PLE pode ser conjugado através de um ligante a um composto de flavaglina para formar um conjugado de fosfolipídio-flavaglina (também referido como um conjugado de PLE-flavaglina). O conjugado pode estar de acordo com a Fórmula II, ou um sal do mesmo:

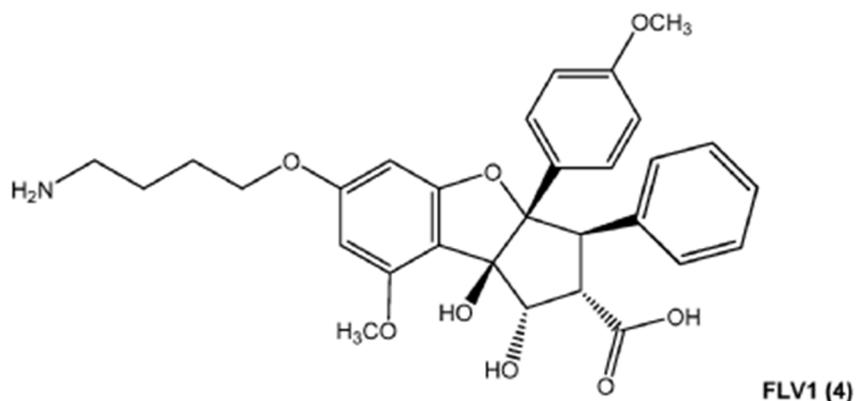


em que, X é ou metileno, ou ligação; Y é um ligante compreendendo um dissulfeto; e Z é um fármaco anticâncer flavaglina. Um conjugado de Fórmula II também pode ser referido como um conjugado de fármaco fosfolipídica (PDC).

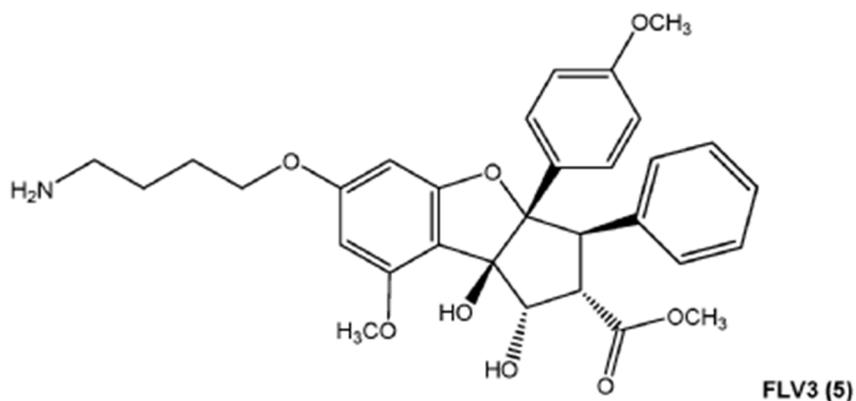
[00079] As flavaglinas são uma família de produtos naturais encontrados em plantas do gênero *Aglaia* (*Meliaceae*). Flavaglinas são caracterizadas por um esqueleto

ciclopenta [b] benzofurano. Flavaglinas podem ter fortes atividades inseticidas, antifúngicas, antiinflamatórias, neuroprotetoras, cardioprotetoras e anticâncer. Flavaglinas pode aumentar a eficácia das quimioterapias e / ou aliviar o efeito adverso cardíaco das quimioterapias. Flavaglinas pode incluir, por exemplo, FLV1, FLV3, um derivado ou análogo do mesmo, ou uma combinação dos mesmos.

[00080] Em algumas concretizações, a flavaglina compreende FLV1, ou um sal do mesmo:



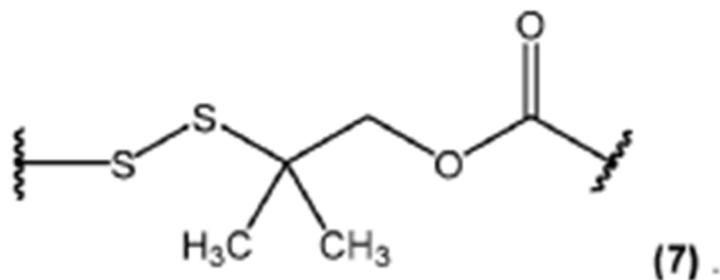
[00081] Em algumas concretizações, a flavaglina compreende FLV3, ou um sal do mesmo:



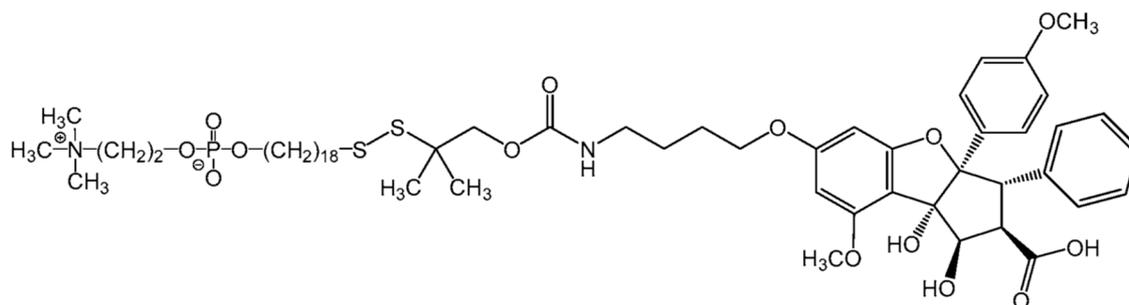
[00082] O composto de flavaglina pode existir como um estereoisômero em que centros assimétricos ou quirais estão presentes. O estereoisômero é "R" ou "S", dependendo da configuração dos substituintes em torno do átomo de carbono

quiral. Os termos "R" e "S" usados neste relatório descritivo são configurações conforme definido nas Recomendações IUPAC 1974 para a Seção E, *Estereoquímica Fundamental*, em *Pure Appl. Chem.*, 1976, 45, 13-30. A divulgação contempla vários estereoisômeros e suas misturas e estes estão especificamente incluídos no escopo desta invenção. Os estereoisômeros incluem enantiômeros e diastereômeros e misturas de enantiômeros ou diastereômeros. Os estereoisômeros individuais dos compostos podem ser preparados sinteticamente a partir de materiais de partida disponíveis comercialmente, que contêm centros assimétricos ou quirais ou por preparação de misturas racêmicas seguidas por métodos de resolução bem conhecidos pelos versados na técnica. Esses métodos de resolução são exemplificados por (1) fixação de uma mistura de enantiômeros a um auxiliar quiral, separação da mistura resultante de diastereômeros por recristalização ou cromatografia e liberação opcional do produto opticamente puro do auxiliar, conforme descrito em *Furniss, Hannaford, Smith e Tatchell, "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry"*, 5ª edição (1989), Longman Scientific & Technical, Essex CM20 2JE, Inglaterra, ou (2) separação direta da mistura de enantiômeros ópticos em colunas cromatográficas quirais, ou (3) métodos de recristalização fracionada.

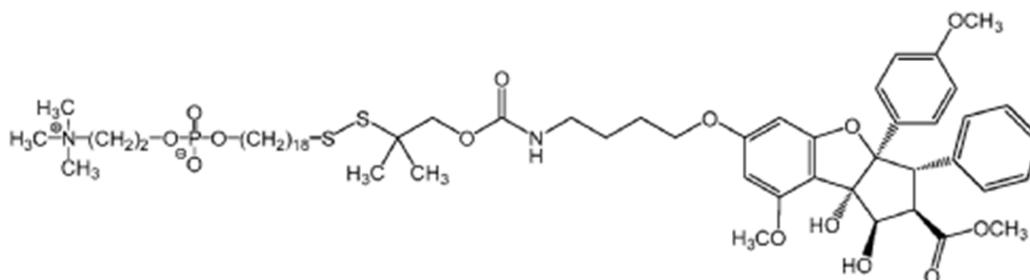
[00083] O ligante pode ser um ligante clivável, como um dissulfeto, e é projetado especificamente para entregar a flavagina a um tumor ou célula cancerosa. Em algumas concretizações, o ligante compreende um dissulfeto. Em algumas concretizações, o ligante compreende o seguinte:



[00084] Em algumas concretizações, o conjugado fosfolipídeo-flavagina é selecionado a partir do seguinte:



CLR 1865 (com FLV1) (8), e



CLR 1852 (com FLV3) (9).

[00085] A presente divulgação também inclui um composto marcado isotopicamente, tal como um PLE marcado isotopicamente, uma flavagina marcada isotopicamente, um ligante marcado isotopicamente ou um conjugado fosfolipídeo-flavagina marcado isotopicamente. Um composto marcado isotopicamente é idêntico àqueles recitados detalhados neste relatório descritivo, mas pelo fato de que um ou mais átomos são substituídos por um átomo com uma massa atômica ou número de massa diferente da massa atômica ou número de massa

normalmente encontrado na natureza. Exemplos de isótopos adequados para inclusão nos compostos da invenção são hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre, flúor e cloro, tais como, mas não limitados a ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , e ^{36}Cl , respectivamente. A substituição por isótopos mais pesados, como deutério, ou seja, ^2H , pode proporcionar certas vantagens terapêuticas resultantes de maior estabilidade metabólica, por exemplo, meia-vida in vivo aumentada ou requisitos de dosagem reduzidos e, portanto, pode ser preferida em algumas circunstâncias. O composto pode incorporar isótopos emissores de pósitrons para imagens médicas e estudos de tomografia emissora de pósitrons (PET) para determinar a distribuição de receptores. Os isótopos emissores de pósitrons adequados que podem ser incorporados em compostos são ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O e ^{18}F . Os compostos marcados isotopicamente podem geralmente ser preparados por técnicas convencionais conhecidas pelos técnicos versados no assunto ou por processos análogos aos descritos nos Exemplos acompanhantes usando reagente marcado isotopicamente apropriado no lugar do reagente não marcado isotopicamente.

[00086] O PLE divulgado ou conjugado fosfolipídeo-flavagina pode existir como sais farmacologicamente aceitáveis. O termo "sal farmacologicamente aceitável" se refere a sais ou zwitterions dos compostos que são solúveis em água ou óleo ou dispersíveis, adequados para o tratamento de distúrbios sem toxicidade indevida, irritação e resposta alérgica proporcionais a uma relação benefício / risco razoável e eficazes para o uso pretendido. Os sais podem ser

preparados durante o isolamento e purificação finais dos compostos ou separadamente por reação de um grupo amino dos compostos com um ácido adequado. Por exemplo, um composto pode ser dissolvido em um solvente adequado, tal como, mas não limitado a metanol e água e tratado com pelo menos um equivalente de um ácido, como ácido clorídrico. O sal resultante pode precipitar e ser isolado por filtração e seco sob temperatura e pressão reduzida. Alternativamente, o solvente e o excesso de ácido podem ser removidos sob pressão reduzida para fornecer um sal. Os sais representativos incluem acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, benzenossulfonato, bissulfato, butirato, canforato, canforossulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemissulfato, heptanoato, hexanoato, formato, nicotinato, fumarato de sulfonato, lactato, maleato-sulfonato, metanossulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, oxalato, maleato, pivalato, propionato, succinato, tartarato, tricloroacetato, trifluoroacetato, glutamato, para-toluenossulfonato, undecanoato, ácido clorídrico, ácido clorídrico, cloridrato. Os grupos amino dos compostos também pode ser quaternizados com cloretos, brometos e iodetos de alquil, tais como metil, etil, propil, isopropil, butil, lauril, miristil, estearil e similares.

[00087] Os sais de adição básicos podem ser preparados durante o isolamento e purificação final dos compostos divulgados pela reação de um grupo carboxila com uma base adequada, como o hidróxido, carbonato ou bicarbonato de um cátion metálico, como lítio, sódio, potássio, cálcio,

magnésio ou alumínio, ou uma amina orgânica primária, secundária ou terciária. Os sais de amina quaternária podem ser preparados, tais como aqueles derivados de metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina, tributilamina, piridina, *N,N*-dimetilanilina, *N*-metilpiperidina, *N*-metilmorfolina, dicitclohexilamina, procaína, dibenzilamina, *N,N*-dibenzilfenetilamina, 1-efenamina e *N,N'*-dibenziletilenediamina, etilenediamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina e semelhantes.

[0088] O conjugado fosfolipídeo-flavaglina pode ser específico para um tumor ou célula cancerosa. Após a administração a um sujeito, o conjugado fosfolipídeo-flavaglina pode localizar em um tumor ou célula cancerosa. O conjugado fosfolipídeo-flavaglina pode localizar ou viajar para o citoplasma ou organela de um tumor ou célula cancerosa. O conjugado fosfolipídeo-flavaglina pode ser incorporado em um tumor ou célula cancerosa mais do que em uma célula saudável. O conjugado fosfolipídeo-flavaglina pode ser incorporado em pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 6 vezes, pelo menos cerca de 7 vezes, pelo menos cerca de 8 vezes, pelo menos cerca de 9 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, pelo menos cerca de 15 vezes, pelo menos cerca de 20 vezes, pelo menos cerca de 25 vezes, pelo menos cerca de 30 vezes mais tumor ou células cancerosas do que células saudáveis.

[00089] A flavaglina pode ser clivada do PLE, tal como clivagem *in vivo* após administração a um sujeito. A

flavaglina pode localizar ou viajar para o citoplasma ou organela de um tumor ou célula cancerosa. A flavaglina pode ser incorporada em um tumor ou célula cancerosa mais do que em uma célula saudável. A flavaglina pode ser incorporada em pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 6 vezes, pelo menos cerca de 7 vezes, pelo menos cerca de 8 vezes, pelo menos cerca de 9 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, pelo menos cerca de 15 vezes, pelo menos cerca de 20 vezes, pelo menos cerca de 25 vezes, pelo menos cerca de 30 vezes mais células tumorais ou cancerosas do que células saudáveis.

a. Síntese

[00090] O PLE pode ser feito sinteticamente de acordo com o Exemplo 1. Alternativamente, o PLE, conforme detalhado neste relatório descritivo, pode ser feito sinteticamente por métodos conhecidos por um versado na técnica. A flavaglina pode ser feita sinteticamente de acordo com o Exemplo 1. Alternativamente, a flavaglina conforme aqui detalhado pode ser feita sinteticamente por métodos conhecidos por um especialista na técnica. Flavaglinas também estão disponíveis comercialmente, por exemplo, na Haoyuan Chemexpress Co. (Xangai, China). O conjugado PLE-flavaglina pode ser feito sinteticamente de acordo com o Exemplo 1. Alternativamente, o conjugado PLE-flavaglina como detalhado aqui pode ser feito sinteticamente por métodos conhecidos por um versado na técnica.

4. Composições farmacêuticas

[00091] Os PLEs e conjugados de fosfolipídeo-flavagina,

conforme detalhado neste relatório descritivo, podem ser formulados em composições farmacêuticas de acordo com técnicas padrão bem conhecidas pelos versados na técnica farmacêutica. A composição pode compreender o composto (tal como um PLE ou conjugado fosfolipídeo-flavaglina) e um veículo farmacêuticamente aceitável. O termo "transportador farmacêuticamente aceitável", tal como aqui utilizado, significa um enchimento não tóxico, sólido inerte, semissólido ou líquido, diluente, material encapsulante ou auxiliar de formulação de qualquer tipo.

[0092] A via pela qual os PLEs divulgados e os conjugados fosfolipídeo-flavaglina são administrados e a forma da composição irá ditar o tipo de transportador a ser usado. A composição farmacêutica pode estar em uma variedade de formas, adequadas, por exemplo, para administração sistêmica (por exemplo, oral, retal, sublingual, bucal, implantes, intranasal, intravaginal, transdérmico, intravenoso, intraarterial, intratumoral, intraperitoneal ou parenteral) ou administração tópica (por exemplo, derme, pulmonar, nasal, aural, ocular, sistemas de entrega de lipossomas ou iontoforese). Em algumas concretizações, a composição farmacêutica é para administração ao sistema nervoso central de um sujeito. As técnicas e formulações podem geralmente ser encontradas em "Remington's Pharmaceutical Sciences," (Meade Publishing Co., Easton, Pa.). As composições farmacêuticas devem ser tipicamente estéreis e estáveis nas condições de fabricação e armazenamento. Todos os transportadores são opcionais nas composições.

[00093] Os transportadores farmacologicamente aceitáveis incluem, por exemplo, diluentes, lubrificantes, ligantes, desintegrantes, corantes, aromatizantes, adoçantes, antioxidantes, conservantes, desluzantes, solventes, agentes de suspensão, agentes umectantes, surfactantes, emolientes, propelentes, umectantes, pós, pH agentes de ajuste e suas combinações.

[00094] Embora as quantidades de componentes nas composições possam variar dependendo do tipo de composição preparada, em geral, as composições sistêmicas podem incluir 0,01% a 50% de um composto (como um PLE ou conjugado fosfolipídico-flavaglina) e 50% para 99,99% de uma ou mais operadoras. As composições para administração parenteral podem incluir tipicamente 0,1% a 10% de um composto e 90% a 99,9% de um ou mais veículos. As formas de dosagem oral podem incluir, por exemplo, pelo menos cerca de 5%, ou cerca de 25% a cerca de 50% de um composto. As composições de dosagem oral podem incluir cerca de 50% a cerca de 95% de transportadores, ou de cerca de 50% a cerca de 75% de transportadores. A quantidade de transportador empregue em conjunto com um composto divulgado é suficiente para fornecer uma quantidade prática de composição para administração por dose unitária do composto. Técnicas e composições para preparar formas de dosagem úteis nos métodos desta invenção são descritas nas seguintes referências: Modern Pharmaceutics, Capítulos 9 e 10, Banker & Rhodes, eds. (1979); Lieberman et al., Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets (1981); e Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 2ª Ed., (1976).

5. Administração

[00095] O PLE ou conjugado fosfolipídeo-flavagina, ou as composições farmacêuticas compreendendo os mesmos podem ser administrados a um sujeito. Tais composições compreendendo um composto (tal como, um PLE ou conjugado fosfolipídeo-flavagina) podem ser administradas em dosagens e por técnicas bem conhecidas pelos técnicos versados no assunto levando em consideração fatores como idade, sexo, peso e condição do sujeito particular, e a via de administração.

[00096] O composto (tal como, um PLE ou conjugado fosfolipídeo-flavaglina) pode ser administrado profilaticamente ou terapeuticamente. Na administração profilática, o composto pode ser administrado em uma quantidade suficiente para induzir uma resposta. Em aplicações terapêuticas, os compostos são administrados a um sujeito que deles necessite em uma quantidade suficiente para produzir um efeito terapêutico. Uma quantidade adequada para conseguir isso é definida como "quantidade terapeuticamente eficaz". As quantidades eficazes para este uso dependerão, por exemplo, da composição particular do regime composto administrado, da forma de administração, do estágio e da gravidade da doença, do estado geral de saúde do paciente e do julgamento do médico prescritor. Uma quantidade terapeuticamente eficaz também é uma em em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais de um composto são superados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo

necessários, para atingir o resultado profilático desejado. Normalmente, 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 terapêuticamente eficaz.

[00097] Por exemplo, uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto pode ser de cerca de 1 mg / kg a cerca de 1000 mg / kg, cerca de 5 mg / kg a cerca de 950 mg / kg, cerca de 10 mg / kg a cerca de 900 mg / kg, cerca de 15 mg / kg a cerca de 850 mg / kg, cerca de 20 mg / kg a cerca de 800 mg / kg, cerca de 25 mg / kg a cerca de 750 mg / kg, cerca de 30 mg / kg a cerca de 700 mg / kg, cerca de 35 mg / kg a cerca de 650 mg / kg, cerca de 40 mg / kg a cerca de 600 mg / kg, cerca de 45 mg / kg a cerca de 550 mg / kg, cerca de 50 mg / kg a cerca de 500 mg / kg, cerca de 55 mg / kg a cerca de 450 mg / kg, cerca de 60 mg / kg a cerca de 400 mg / kg, cerca de 65 mg / kg a cerca de 350 mg / kg, cerca de 70 mg / kg a cerca de 300 mg / kg, cerca de 75 mg / kg a cerca de 250 mg / kg, cerca de 80 mg / kg a cerca de 200 mg / kg, cerca de 85 mg / kg a cerca de 150 mg / kg e cerca de 90 mg / kg a cerca de 100 mg / kg.

[00098] O composto pode ser administrado por métodos bem conhecidos no estado da técnica, conforme descrito em Donnelly et al. (Ann. Rev. Immunol. 1997, 75, 617-648); Feigner et al. (Patente US No. 5,580,859, concedida em 3 de dezembro de 1996); Feigner (Patente US No. 5,703,055, concedida em 30 de dezembro de 1997); e Carson et al. (Patente US No. 5,679,647, concedida em 21 de outubro de 1997), cujos conteúdos são incorporados neste relatório

descritivo por referência em sua totalidade. O composto pode ser complexado a partículas ou grânulos que podem ser administrados a um indivíduo, por exemplo, usando uma arma de vacina. Um especialista na técnica saberia que a escolha de um transportador farmacologicamente aceitável, incluindo um composto fisiologicamente aceitável, depende, por exemplo, da via de administração.

[00099] O composto pode ser entregue através de uma variedade de rotas. As vias de distribuição típicas incluem administração parentérica, por exemplo, administração intradérmica, intramuscular ou subcutânea. Outras vias incluem a administração oral, intranasal, intravaginal, transdérmica, intravenosa, intra-arterial, intratumoral, intraperitoneal e vias epidérmicas. Em algumas concretizações, o composto é administrado por via intravenosa, intra-arterial ou intraperitoneal ao sujeito. Em algumas concretizações, o composto é administrado ao sujeito por via intravenosa. Em algumas concretizações, o composto é administrado ao sujeito por via oral.

[000100] Em algumas concretizações, o composto é administrado em uma formulação de liberação controlada. O composto pode ser liberado na circulação, por exemplo. Em algumas concretizações, o composto pode ser liberado ao longo de um período de pelo menos cerca de 1 dia, pelo menos cerca de 2 dias, pelo menos cerca de 3 dias, pelo menos cerca de 4 dias, pelo menos cerca de 5 dias, pelo menos cerca de 6 dias, pelo menos cerca de 7 dias, pelo menos cerca de 1 semana, pelo menos cerca de 1,5 semanas, pelo menos cerca de

2 semanas, pelo menos cerca de 2,5 semanas, pelo menos cerca de 3,5 semanas, pelo menos cerca de 4 semanas, ou pelo menos cerca de 1 mês.

[000101] O composto pode ser administrado em dose única ou episodicamente ou em doses repetidas. Por exemplo, o composto pode ser administrado uma vez a cada hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas, 25 horas, 36 horas, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas ou 4 semanas.

6. Métodos

a. Métodos de tratamento do câncer em um sujeito

[000102] São fornecidos aqui métodos de tratamento de câncer em um sujeito. O método pode incluir a administração ao sujeito de um conjugado de fosfolipídeo-flavagina conforme detalhado neste relatório descritivo. Em algumas concretizações, o câncer é selecionado de melanoma, câncer de cérebro, câncer de pulmão, câncer adrenal, câncer de fígado, câncer renal ou renal, câncer de pâncreas, câncer de esôfago, câncer gástrico, câncer de estômago, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer anal, próstata câncer, câncer de ovário, câncer de mama, câncer cervical, linfoma, leucemia, mieloma, câncer hematológico, hepatocarcinoma, retinoblastoma, glioma, sarcoma, blastoma, carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma.

b. Métodos de direcionamento de um fármaco para um tumor ou célula cancerosa em um sujeito

[000103] São fornecidos aqui métodos de direcionamento de um fármaco a um tumor ou célula cancerosa em um sujeito. O método pode incluir a administração ao sujeito de um

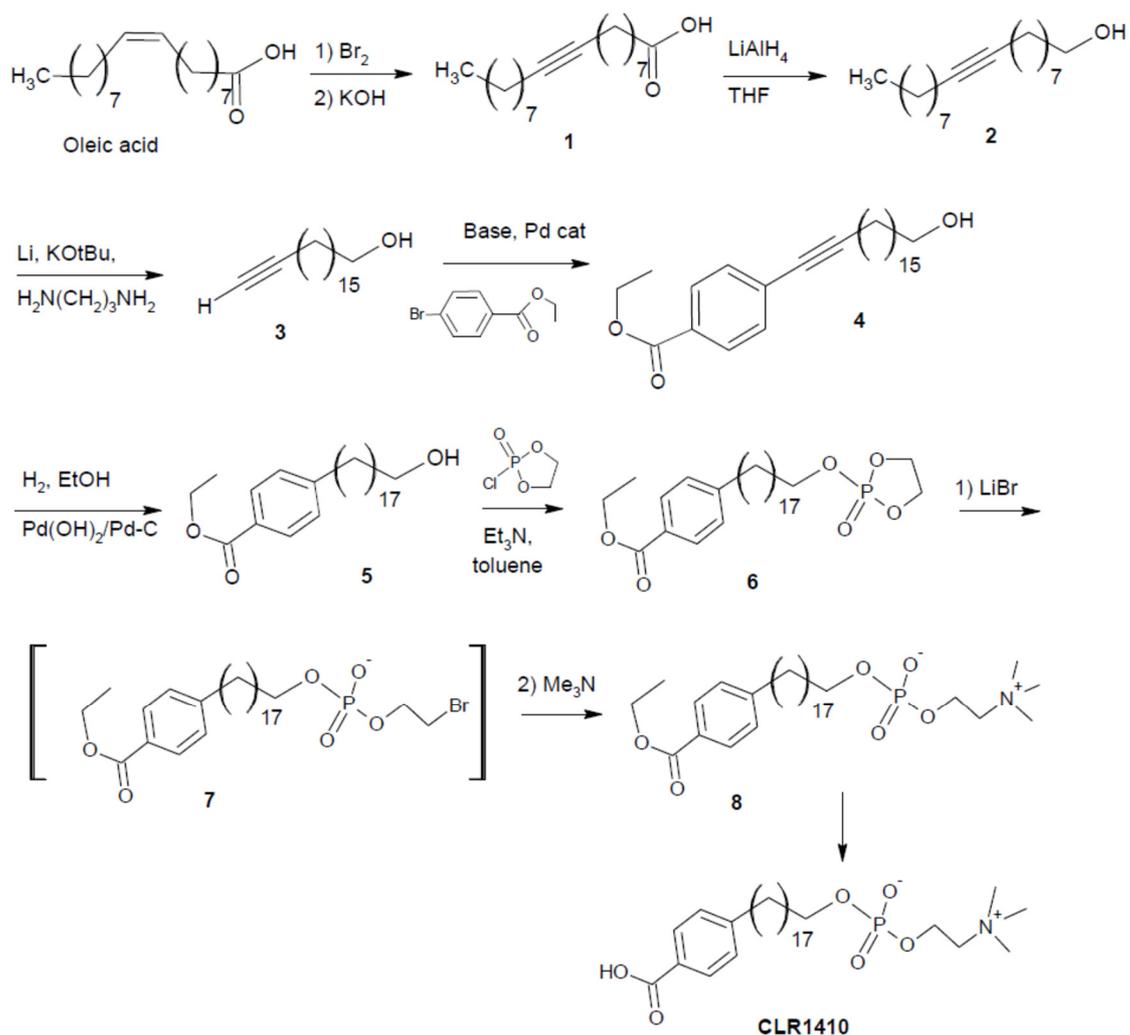
conjugado de fosfolipídeo-flavagina conforme detalhado neste relatório descritivo. Em algumas concretizações, o câncer é selecionado de melanoma, câncer de cérebro, câncer de pulmão, câncer adrenal, câncer de fígado, câncer renal ou renal, câncer de pâncreas, câncer de esôfago, câncer gástrico, câncer de estômago, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer anal, próstata câncer, câncer de ovário, câncer de mama, câncer cervical, linfoma, leucemia, mieloma, câncer hematológico, hepatocarcinoma, retinoblastoma, glioma, sarcoma, blastoma, carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma.

7. Exemplos

Exemplo 1

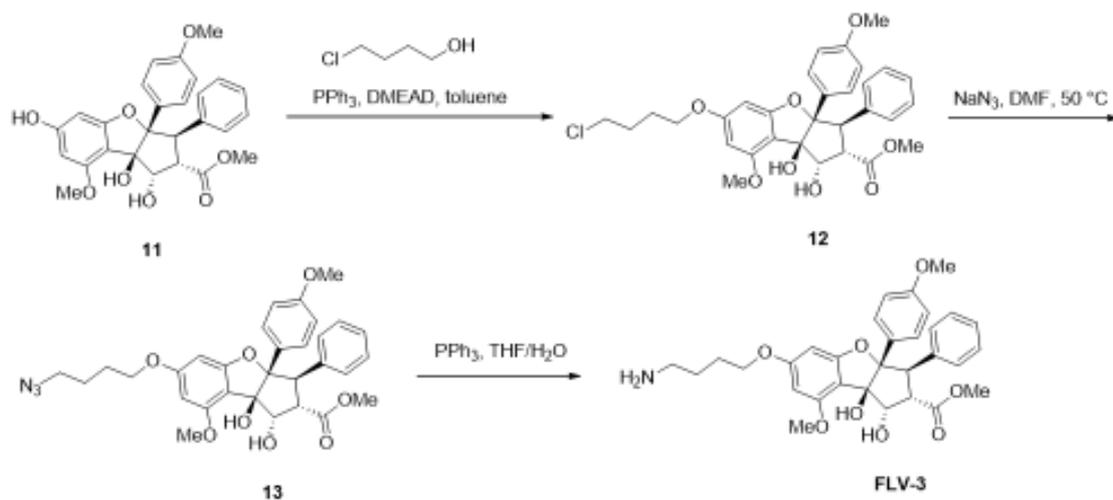
Síntese Química

[000104] *PLEs*. Os *PLEs* foram feitos sinteticamente de acordo com o Esquema 1 abaixo:



Esquema 1

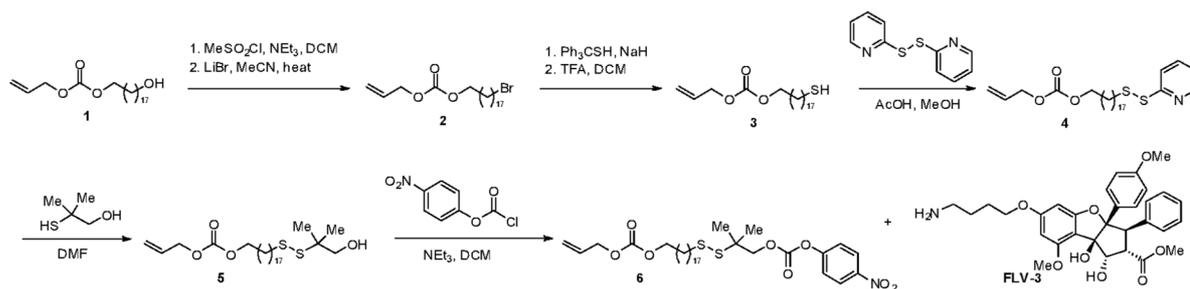
[000105] *Flavaglinas*. Flavaglinas estavam disponíveis comercialmente. FLV1 e FLV3 foram adquiridos da Haoyuan Chemexpress Co. (Shanghai, China). FLV1 e FLV3 foram alternativamente feitos sinteticamente, de acordo com o Esquema 2 abaixo:

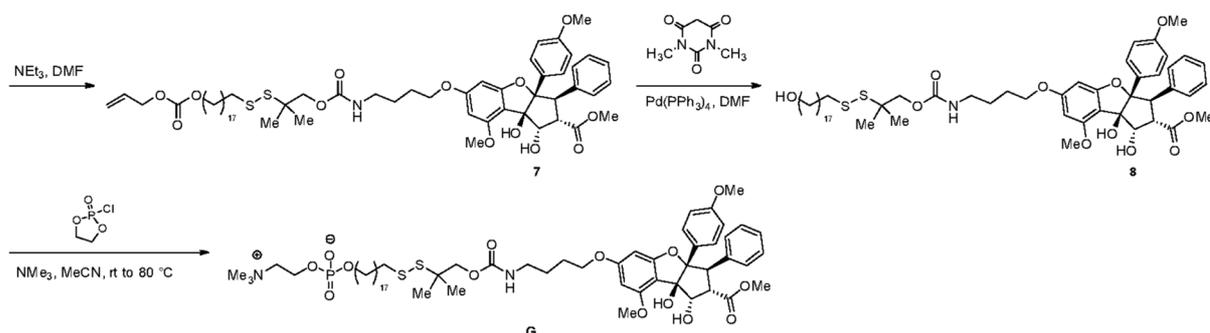


Entada	SM	Scala	Produto	Condições	Rendimento	Comentários
1	13	0.317 g	FLV3	50 °C, 10 h	0.235 g (78%)	¹ H NMR consistente.
2	11	0.170 g	12	0 °C a TA, O/N	--	Reação em progresso.

Esquema 2

[000106] *Construções de PLE-flavaglina*. CLR 1852 (composto (9)) e CLR 1865 (composto (8)) foram feitos sinteticamente de acordo com o Esquema 3 abaixo:





Esquema 3

Exemplo 2

Presença de jangadas lipídicas nas células tumorais

[0107] Mais de 100 linhas celulares foram coradas com a subunidade B da toxina da cólera, fixadas com formaldeído a 4% e coradas com filipina III por 30 minutos. Como mostrado na FIG. 1A-FIG. 1 D, quase todos os tipos de tumor testados demonstraram alta concentração de jangadas de lipídios na membrana celular (mais de 100 linhas celulares, amostras frescas de pacientes, etc.). Como mostrado na FIG. 1E, células A549 foram co-cultivadas com células de fibroblastos normais por 48 horas e, em seguida, coradas com a subunidade B da toxina da cólera, fixadas com formaldeído a 4% e coradas com filipina III por 30 minutos. Esses resultados demonstraram que as células tumorais possuem uma concentração maior de jangadas lipídicas do que as células normais.

Exemplo 3

Captação seletiva de PDCs em células tumorais

[000108] Fibroblastos normais e células tumorais Caki-2 (carcinoma de células renais de células claras humanas) foram semeados e co-cultivados durante a noite (FIG. 1F). As células foram então incubadas com 5 mM de CLR 1501 (composto

(1)) durante 24 horas a 37° C em meio completo. No dia seguinte, as células foram lavadas e co-coradas com coloração de núcleo (Hoescht 33342). CLR 1501 estava animado e então detectado com um filtro Alexa-Fluor 488. CLR 1501 estava altamente localizado nas células Caki-2 e minimamente nas células de fibroblastos normais.

Exemplo 4

Perturbação da absorção reduzida de jangadas de lipídios de PDCs

[000109] Células A549 foram semeadas durante a noite em poços separados. No dia seguinte, as células não foram tratadas (FIG. 1G) ou tratadas com metil β -ciclodextrina (FIG. 1 H), que demonstrou interromper seletivamente as jangadas lipídicas. Todas as células foram então incubadas durante 24 horas com 5 μ M de CLR 1501 (composto (1)). A interrupção da maioria das jangadas lipídicas em células A549 resultou em 60% de redução na absorção de CLR 1501 (FIG. 1 H) em comparação com células não tratadas (FIG. 1G).

Exemplo 5

Localização de PDCs para o retículo Endoplasmático

[000110] Células de adenocarcinoma de próstata humana (PC3) foram semeadas durante a noite na microplaca VI (Ibidi, Verona, WI), e, então incubadas com 5 μ M de CLR 1501 (composto (1)) por 24 horas a 37 ° C em meio completo. Após a lavagem, as células foram co-coradas com ER-tracker® por protocolo e fotografadas usando microscópio de luz confocal Nikon A1 R. CLR 1501 e ER foram excitados e detectados usando Alexa-Fluor 488 usando filtros de fluoresceína padrão. CLR 1501 co-localizado com ER em maligno (FIG. 11-FIG. 1 K), mas

não com células normais (não mostrado).

Exemplo 6

Localização de PDCs para o retículo Endoplasmático

[000111] Linhagens celulares PC3 (grau IV, adenocarcinoma de próstata humano) foram cultivadas durante a noite em micro lâmina VI (Ibidi, Verona, WI). No dia seguinte, as células foram incubadas com 5 pM de CLR 1501 (composto (1)) durante 24 horas a 37 ° C em meio completo. No dia seguinte após a lavagem com PBS, as células foram coradas com coloração de núcleo (Hoechst 33342) e marcador de mitocôndria (Mitotracker®) (Invitrogen, Carlsbad, CA). As células foram observadas usando microscópio confocal Nikon A1 R. CLR 1501 foi excitado e detectado usando o filtro Alexa-Fluor 488, enquanto a coloração do núcleo e a coloração da mitocôndria foram excitadas e detectadas usando o filtro DAPI e o filtro Texas-Red, respectivamente. CLR 1501 foi colocalizado com mitocôndrias (FIG. 1 L-FIG. 1 N).

Exemplo 7

PDCs fornecem entrega direcionada *in vivo*

[000112] Tumor colorretal (HCT-1 16) com camundongo nu foi injetado com 1 mg de CLR 1502 (composto (2)) e fotografado no Pearl Infrared Imaging System. A cor diferente reflete a intensidade do CLR 1502 ao longo do tempo. Aproximadamente 5,5 horas após a injeção, o tumor ainda apresentava cor vermelha (refletindo a maior distribuição de CLR 1502) (FIG. 2). Em 24 horas, foi obtida a distribuição máxima de CLR 1502. Alvo inicial observado em 30 minutos (não mostrado).

Exemplo 8**PDCs citotóxicos fornecem direcionamento e índice terapêutico potencialmente melhorado**

[000113] Células A549 (adenocarcinoma de pulmão humano) e fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF) foram semeados em placas de 96 poços durante a noite. Todas as células foram tratadas com concentrações crescentes do composto citotóxico parental sozinho (FLV1 ou FLV3) ou do PDC (composto citotóxico parental conjugado à fração PLE com ligante clivável, CLR 1865 (composto (8)) ou CLR 1852 (composto (9))). O composto citotóxico original mostrou potência quase igual às células A549, assim como às células NHDF. No entanto, as moléculas de PDC mostraram seletividade para as células A549 (FIG. 3). As moléculas de PDC quase não mostraram efeito nas células NHDF até as concentrações mais altas e quase potência semelhante à molécula parental nas células A549.

Exemplo 9**PDCs citotóxicos fornecem direcionamento**

[000114] Foi avaliada a absorção de CLR 1852 (composto (9)) em células A375 (melanoma humano) e HEK293 (rim embrionário humano). As células foram incubadas com CLR 1852 (composto (9)) durante 24 horas. Foi demonstrado que as células tumorais possuíam um aumento de 6 a 28 vezes em PDCs em comparação com as células normais em 24 horas de tratamento (FIG. 4).

[000115] Os resultados dos Exemplos 2-9 indicaram que as moléculas de éter fosfolipídico têm como alvo as células tumorais por meio de jangadas lipídicas. PDCs mostraram

absorção significativa em células tumorais contra células normais, mesmo em co-cultura. Ao entrar nas células tumorais, PDCs rastreados para a mitocôndria e retículo endoplasmático. *In vivo*, os PDCs direcionados e rapidamente acumulados dentro do tumor. Os PDCs citotóxicos proporcionaram um direcionamento melhorado e o potencial para uma maior segurança.

Exemplo 10

Captação celular de PLE

[000116] Várias linhagens de células cancerosas foram expostas *in vitro* e *in vivo* a um PLE marcado com fluorescência (CLR 1501, composto (1)). A captação de células tumorais foi medida continuamente durante 24 horas. Os resultados são mostrados na TABELA 1 e FIG. 5, FIG. 6 e FIG. 7. O composto PLE era específico para tumores e células cancerosas.

[000117] PLE marcado com fluorescência (CLR 1501, composto (1)) foi administrado a tecidos benignos e não foi observada absorção (TABELA 2).

TABELA 1. Absorção celular *in vitro* de PLE.

Modelo Tumoral		Espécies	Categoria	Absorção Tumoral
1	Próstata PC-3	Camundongo SCID	Adenocarcinoma	Sim
2	Pulmão A-549 (NSCLC)	Camundongo SCID	Adenocarcinoma	Sim
3	Pulmão NCI H-69 (Célula de aveia)	Camundongo SCID	Adenocarcinoma	Sim
4	Adrenal H-295	Camundongo SCID	Adenocarcinoma	Sim

5	Adrenal RL-251	Camundongo SCID	Adenocarcinoma	Sim
6	Cólon-51	Camundongo SCID	Adenocarcinoma colorretal	Sim
7	Cólon LS180	Camundongo SCID	Adenocarcinoma colorretal	Sim
8	Cólon DLDI	Camundongo SCID	Adenocarcinoma colorretal	Sim
9	Cólon HT-29	Camundongo SCID	Adenocarcinoma colorretal	Sim
10	Colon LS-180	Camundongo nú	Adenocarcinoma	Sim
11	Melanoma A-375	Camundongo nú	Adenocarcinoma	Sim
12	Ovário HTB-77	Camundongo nú	Adenocarcinoma	Sim
13	BXPC3 pancreática	Camundongo nú	Adenocarcinoma	Sim
14	Capan-1 pancreática	Camundongo nú	Adenocarcinoma	Sim
15	Célula renal Caki-2	Camundongo nú (orthotopic)	Adenocarcinoma	Sim
16	Célula renal ACHN	Camundongo nú (orthotopic)	Adenocarcinoma	Sim
17	SCC1	Camundongo nú	Carcinoma cellular escamoso	Sim
18	SCC6	Camundongo nú	Adenocarcinoma	Sim
19	Próstata LnCap	Camundongo	Adenocarcinoma	Sim

20	Próstata LuCap	Camundongo	Adenocarcinoma	Sim
21	MCF-7 da mama	Rato	Adenocarcinoma	Sim
22	4T1 da mama	Camundongo endógeno (ortotópico)	Adenocarcinoma	Sim
23	MatLyLu da próstata	Rat	Adenocarcinoma	Sim
24	Walker-256	Rato	Carcinosarcoma	Sim
25	TRAMP da próstata	Camundongo endógeno	Adenocarcinoma	Sim
26	CT-26 do cólon	Camundongo SCID	Adenocarcinoma	Sim
27	Min Camundongo Intestinal	Camundongo endógeno	Adenocarcinoma	Sim
28	Melanoma	Camundongo	Adenocarcinoma	Sim
29	SCC mamária	Apc ^{Min/+} camundongo	Carcinoma celular escamoso	Sim
30	AC mamária	Apc ^{Min/+} camundongo	Adenocarcinoma	Sim
31	Carcinoma Hepatocelular	Camundongo endógeno	Adenocarcinoma	Sim
32	Glioma L9	Xenoinxerto de Rato	Glioma	Sim
33	Glioma C6	Xenoinxerto de Rato	Glioma	Sim
34	Glioma CNS1	Xenoinxerto de Rato	Glioma	Sim
35	Glioma RG2	Xenoinxerto de Rato	Glioma	Sim

36	Retinoblastoma	Camundongo endógeno	Blastoma	Sim
37	c-myc pancreática	Camundongo endógeno	Adenocarcinoma	Sim
38	Kras pancreática	Camundongo endógeno	Adenocarcinoma	Sim
39	Cervical	Camundongo endógeno	Adenocarcinoma	Sim
40	Sarcoma (Meth-A)	Camundongo nú	Fibrosarcoma	Sim
41	Esofágica	Camundongo endógeno	Adenocarcinoma	Sim

TABELA 2. Captação de CLR1404 em tecidos benignos.

Modelo Tumoral		Espécies	Categoria	Absorção Tumoral
1	Polip. Intestinal	Camundongo endógeno	Adenoma (benigno)	Não
2	Hiperplasia alveolar mamária	Camundongo endógeno	Hiperplasia (benigna)	Não

Exemplo 11

Atividade de conjugados PLE-Flavaglina em células cancerosas

[000118] Os conjugados PLE-flavaglina CLR 1852 (composto (9)) e CLR 1865 (composto (8)) foram administrados às linhas celulares A375 (melanoma maligno humano), A549 (adenocarcinoma de pulmão humano), HCT 1 16 (côlon humano câncer) e NHDF (fibroblastos dérmicos humanos normais). O IC₅₀ foi calculado. Os resultados são mostrados na TABELA 3.

TABELA 3. IC₅₀ (pM / mL) em várias linhagens de células cancerosas.

Composto	A375	A549	HCT 116	NHDF	Índice Terapêutico (TI)
FLV3	0,015	0,09	0,009	0,008	0,89
CLR 1852	0,9	0,02	0,06	7,2 (18.3)	360 (915)
CLR 1865	9,75	0,67	1,28	7,8 (25)	11,64 (37,3)

[000119] A citotoxicidade do CLR 1852 foi determinada em várias concentrações. Como mostrado na FIG. 8, CLR 1852 apresentou perda modesta de potência em comparação com FLV3 sozinho, talvez devido à liberação incompleta.

[000120] A estabilidade de CLR 1865 (composto (8)), CLR 1852 (composto (9)) e FLV3 no plasma foi examinada, com propantelina como controle (TABELA 4). Uma pequena quantidade da molécula foi exposta ao plasma, e o plasma foi então analisado por HPLC ou MS para determinar se a molécula estava degradada. CLR 1865 e CLR 1852 mostraram excelente estabilidade no plasma humano. CLR 1852 superou CLR 1865 em plasma de camundongo. CLR 1865 só foi estável em plasma de camundongo por 3,3 horas. CLR 1852 foi estável no plasma durante pelo menos 7 horas.

TABELA 4. Estabilidade do plasma.

Composto	Meia-vida em humano (min)	Meia-vida em camundongo (min)
CLR 1852	>400	>400
CLR 1865	>400	199
propantelina	54	85

[000121] O índice terapêutico (TI) de CLR 1865 e CLR 1852 foi examinado em camundongos (TABELA 5). Listadas na Tabela 5 estão as doses administradas aos camundongos e

quantos camundongos estavam vivos após o tratamento (“3/3” indica que 3 de 3 camundongos estavam vivos). Tanto o CLR 1852 quanto o CLR 1865 mostraram excelente melhora na tolerabilidade em comparação com o FLV3 sozinho. CLR 1852 não atingiu uma dose máxima tolerada (MTD), talvez porque sua solubilidade limitou uma dosagem maior. O MTD para CLR 1865 foi entre 5 e 10 mg / kg. O índice terapêutico *in vivo* foi de pelo menos 25 para CLR 1852 e 12,5 para CLR 1865.

TABELA 5. Índice terapêutico *in vivo*.

Dose (mg/kg)	FLV3	CLR 1852	CLR 1865
0,1	3/3	3/3	3/3
0,25	3/3	3/3	3/3
0,5	LD	3/3	3/3
1,0	n/a	3/3	3/3
5,0	n/a	3/3	3/3
10,0	n/a	3/3	2/3

[000122] A eficácia para CLR 1852 em células HCT 116 (câncer de cólon humano) foi examinada. CLR 1852 foi administrado a células HCT 116 em três doses de 1 mg / mg cada. Em comparação com o veículo, CLR 1852 reduziu o volume do tumor começando por volta de 27 dias (FIG. 9). Em comparação com o veículo, CLR 1582 causou perda de peso modesta, presumivelmente devido à toxicidade (FIG. 10). CLR 1582 forneceu pelo menos um aumento de seis vezes na tolerabilidade em comparação com FLV3 sozinho (dados não mostrados).

[000123] CLR 1852 e FLV3 sozinhos foram administrados a células A375 e A549. Os níveis de FLV3 no lisado celular

e no meio de crescimento foram medidos usando LC / MS. Como mostrado na FIG. 11, níveis elevados de FLV3 estavam presentes no lisado celular após 24 horas. Níveis moderados de FLV3 estavam presentes no meio de crescimento após 24 horas. Os níveis de FLV3 intracelular pareceram estabilizar às 24 horas, enquanto os níveis extracelulares de FLV3 continuaram a aumentar.

[000124] A descrição anterior dos aspectos específicos revelará tão completamente a natureza geral da invenção que outros podem, aplicando o conhecimento dentro da perícia da técnica, prontamente modificar e / ou adaptar para várias aplicações tais aspectos específicos, sem experimentação indevida, sem se afastar do conceito geral da presente divulgação. Portanto, tais adaptações e modificações destinam-se a estar dentro do significado e faixa de equivalentes dos aspectos divulgados, com base no ensino e na orientação aqui apresentados. Deve ser entendido que a fraseologia ou terminologia neste relatório descritivo tem o propósito de descrição e não de limitação, de modo que a terminologia ou fraseologia da presente especificação deve ser interpretada pelo especialista na técnica à luz dos ensinamentos e orientação.

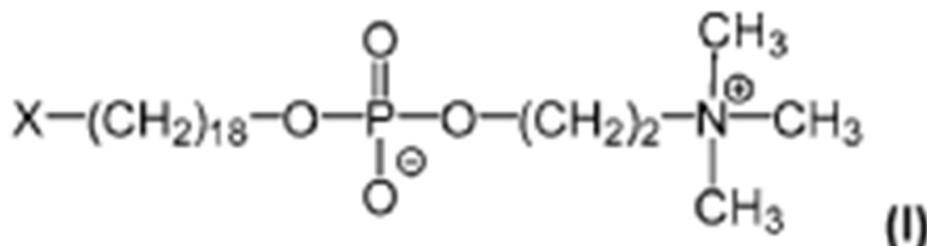
[000125] A amplitude e o escopo da presente divulgação não devem ser limitados por qualquer um dos aspectos exemplificativos descritos acima, mas devem ser definidos apenas de acordo com as reivindicações seguintes e seus equivalentes.

[000126] Todas as publicações, patentes, pedidos de patente e / ou outros documentos citados neste pedido são

incorporados por referência em sua totalidade para todos os fins, na mesma medida como se cada publicação individual, patente, pedido de patente e / ou outro documento foram individualmente indicados para serem incorporados por referência para todos os fins.

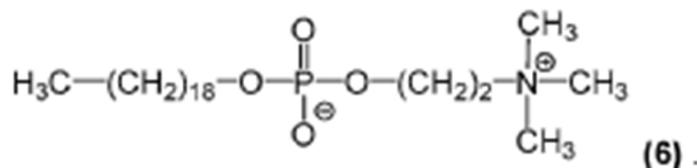
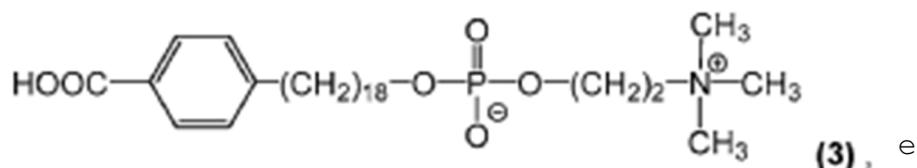
[000127] Por razões de integridade, vários aspectos da invenção são estabelecidos nas seguintes cláusulas numeradas:

[000128] Cláusula 1. Um éter fosfolipídico (PLE) de acordo com a Fórmula I, ou um sal do mesmo:



em que X é hidrogênio, metil ou fenil substituído com carboxil.

[000129] Cláusula 2. O PLE da cláusula 1, selecionado a partir do seguinte:

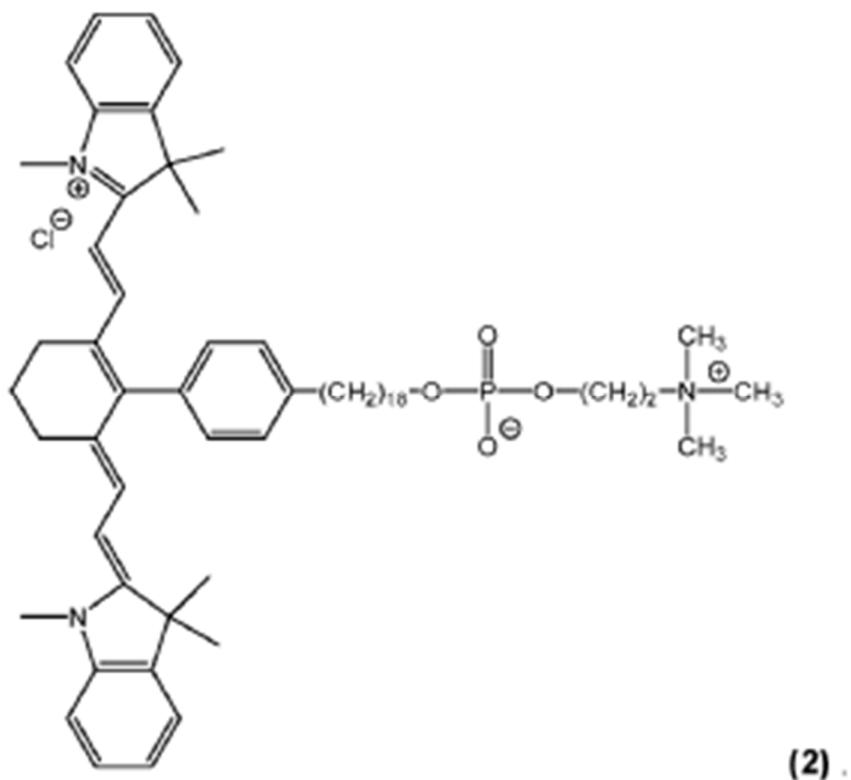
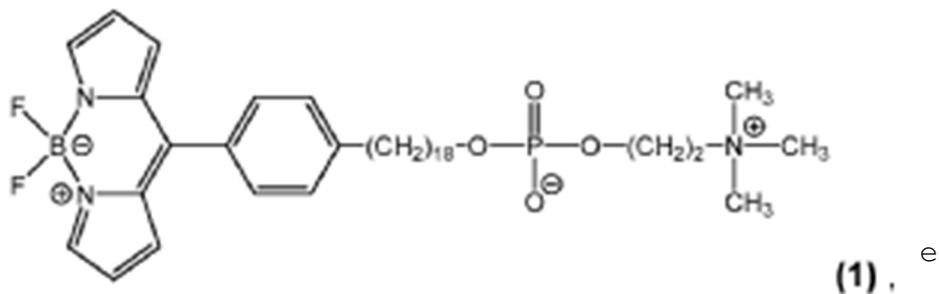


[000130] Cláusula 3. O PLE da cláusula 1 ou 2, compreendendo ainda uma fração detectável anexada ao mesmo.

[000131] Cláusula 4. Uma composição compreendendo o PLE

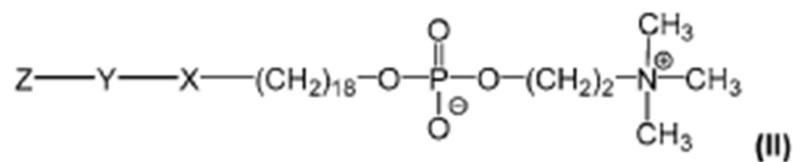
da cláusula 1 ou 2 ou 3 e um transportador.

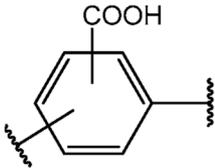
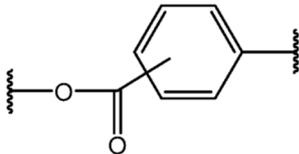
[000132] Cláusula 5. Um composto selecionado a partir dos seguintes:



[000133] Cláusula 6. Uma composição que compreende o composto da cláusula 5 e um transportador.

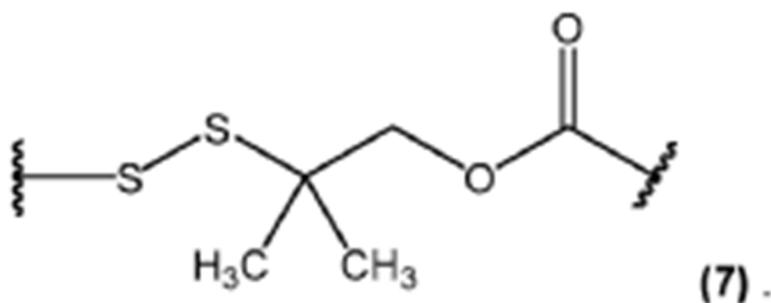
[000134] Cláusula 7. Um conjugado, de acordo com a Fórmula II, ou um sal do mesmo:



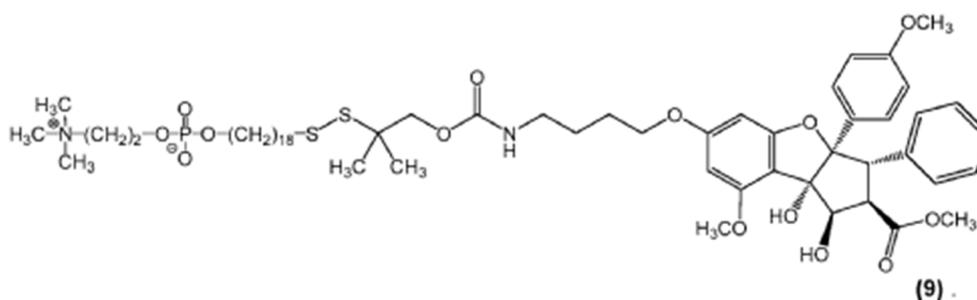
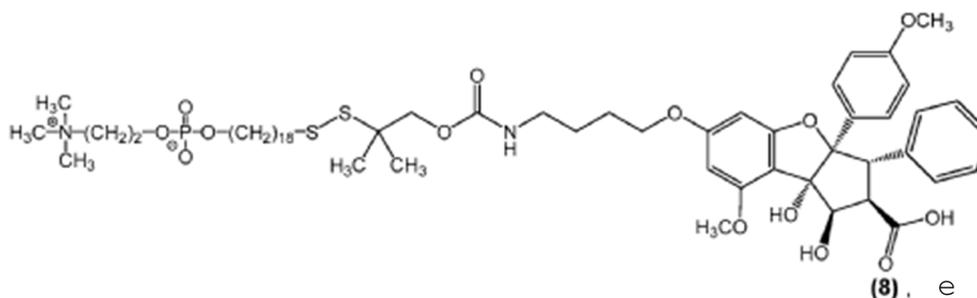
em que X é  , ou  , ou metileno, ou ligação; Y é um ligante compreendendo um dissulfeto; e Z é uma fármaco anticâncer flavaglina.

[000135] Cláusula 8. O conjugado da cláusula 7, em que a fármaco anticâncer flavaglina compreende FLV-1, FLV-3, um derivado ou análogo do mesmo, ou uma combinação dos mesmos.

[000136] Cláusula 9. O conjugado de qualquer uma das cláusulas 7-8, em que o ligante compreende o seguinte:



[000137] Cláusula 10. O conjugado de qualquer uma das cláusulas 7 a 9, selecionado a partir do seguinte:



[000138] Cláusula 11. Uma composição compreendendo o conjugado de qualquer uma das cláusulas 7 a 10 e um transportador farmacologicamente aceitável.

[000139] Cláusula 12. Método de tratamento de câncer em um sujeito, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao sujeito do conjugado de qualquer uma das cláusulas 7-10.

[000140] Cláusula 13. Método para direcionar um fármaco a um tumor ou célula cancerosa em um sujeito, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao sujeito do conjugado de qualquer uma das cláusulas 7-10.

[000141] Cláusula 14. O método de qualquer uma das cláusulas 12 a 13, em que o fármaco anticâncer flavaglina localiza ou viaja para o citoplasma ou organela do tumor ou célula cancerosa.

[000142] Cláusula 15. O método de qualquer uma das cláusulas 12 a 13, em que o conjugado ou fármaco anticâncer de flavaglina é seletivo para células cancerosas no sujeito.

[000143] Cláusula 16. O método de qualquer uma das cláusulas 12-13, em que o conjugado ou fármaco anticâncer de flavaglina é incorporado em pelo menos cerca de 2 vezes mais células tumorais ou cancerosas do que células saudáveis.

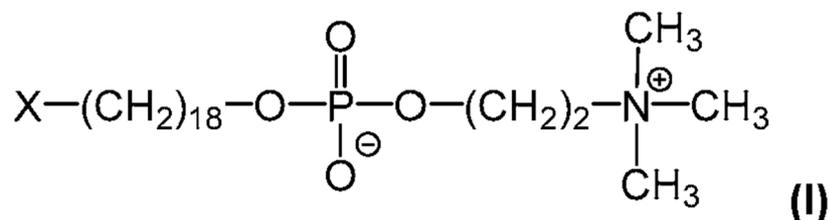
[000144] Cláusula 17. O método de qualquer uma das cláusulas 12-16, em que o câncer é selecionado de melanoma, câncer cerebral, câncer de pulmão, câncer adrenal, câncer de fígado, câncer renal ou renal, câncer pancreático, câncer de esôfago, câncer gástrico, câncer de estômago, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer anal, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de mama, câncer cervical, linfoma,

leucemia, mieloma, câncer hematológico, hepatocarcinoma, retinoblastoma, glioma, sarcoma, blastoma, carcinoma de células escamosas, e adenocarcinoma.

[000145] Cláusula 18. O método de qualquer uma das cláusulas 12 a 17, em que o sujeito é humano.

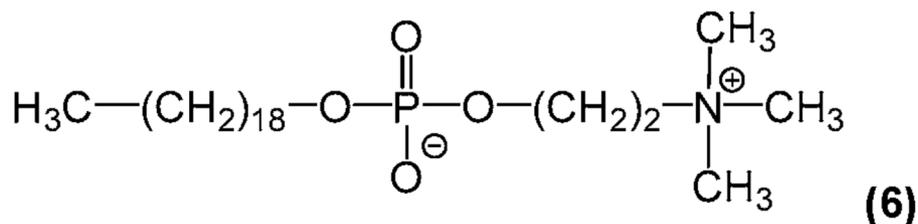
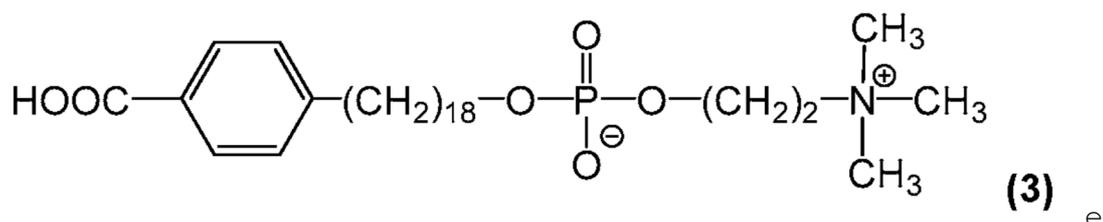
REIVINDICAÇÕES

1. Éter fosfolipídico (PLE) **caracterizado pelo** fato de que é como a Fórmula I, ou um sal do mesmo:



em que X é hidrogênio, metil ou fenil substituído com carboxil.

2. PLE, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que é selecionado a partir do seguinte:

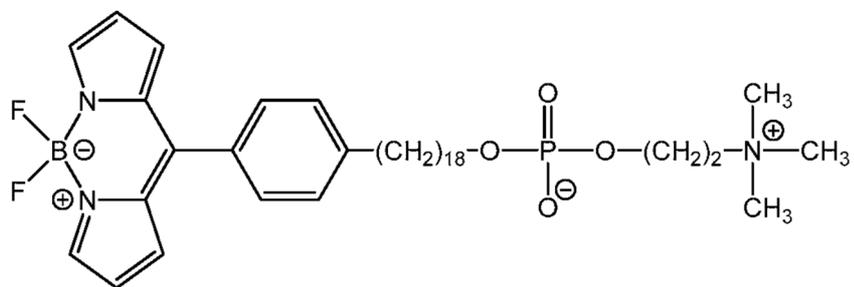


3. PLE, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado pelo** fato de que compreende ainda uma fração detectável ligada ao mesmo.

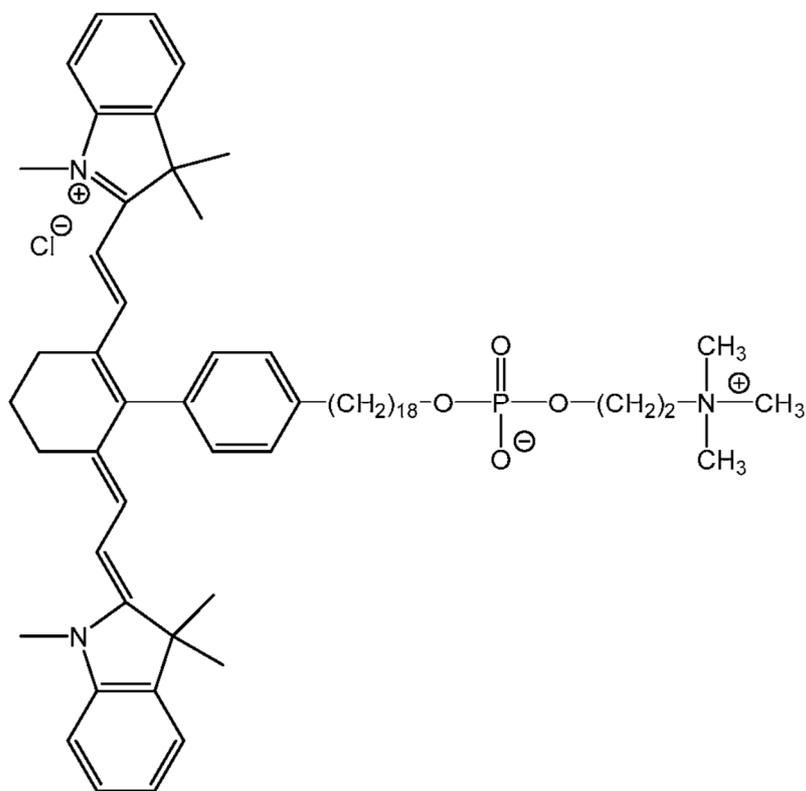
4. Composição **caracterizada pelo** fato de que compreende o PLE conforme definido pela reivindicação 1 a 3 e um carreador.

5. Composto **caracterizado pelo** fato de que é selecionado

a partir do seguinte:



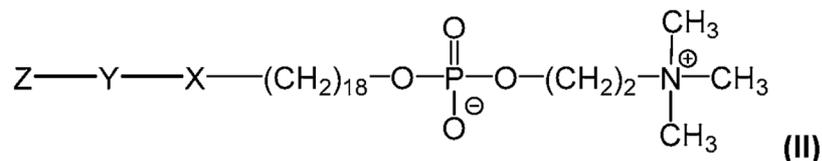
(1), e

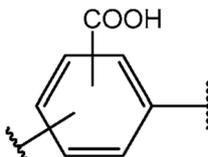
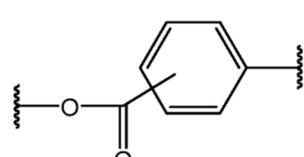


(2)

6. Composição **caracterizada pelo** fato de que compreende o composto conforme definido pela reivindicação 5 e um transportador.

7. Conjugado **caracterizado pelo** fato de que é conforme a Fórmula II, ou um sal do mesmo:



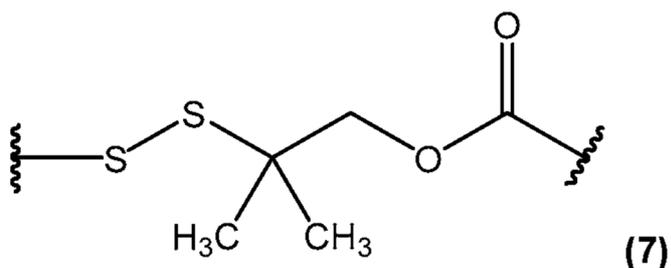
em que X é  ou  ou metileno, ou uma ligação;

Y é um ligante compreendendo um dissulfeto; e

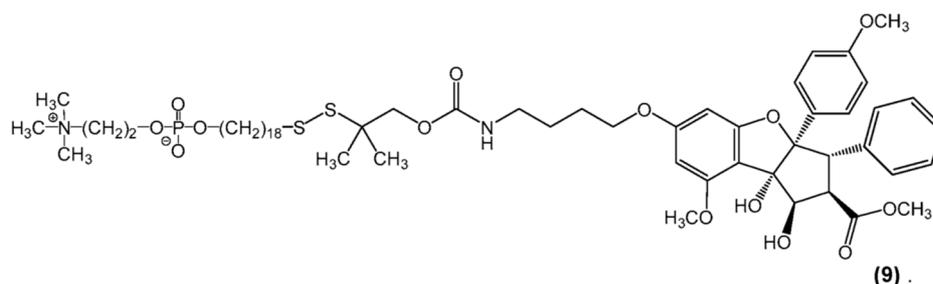
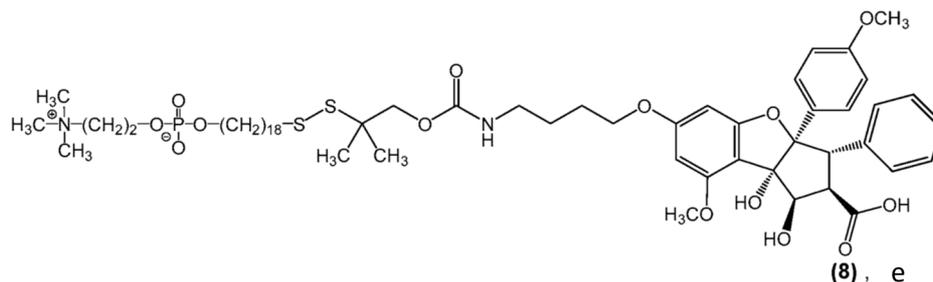
Z é um fármaco flavaglina anticâncer.

8. Conjugado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato de que o fármaco flavaglina anticâncer compreende FLV-1, FLV-3, um derivado ou análogo do mesmo, ou uma combinação dos mesmos.

9. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 8, **caracterizado pelo** fato de que o ligante compreende o seguinte:



10. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, caracterizado pelo fato de que é selecionado a partir do seguinte:



11. Composição **caracterizada pelo** fato de que compreende o conjugado conforme definido por qualquer uma das reivindicações 7 a 10 e um carreador farmacologicamente aceitável.

12. Método de tratamento de câncer em um sujeito, o método **caracterizado pelo** fato de que compreende a administração ao sujeito do conjugado conforme definido por qualquer uma das reivindicações 7 a 10.

13. Método para direcionar um fármaco a um tumor ou célula cancerosa em um sujeito, o método **caracterizado pelo** fato de que compreende a administração ao sujeito do conjugado conforme definido por qualquer uma das reivindicações 7 a 10.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 13, **caracterizado pelo** fato de que o fármaco flavaglina anticâncer localiza ou viaja para o citoplasma ou organela do tumor ou célula cancerosa.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 13, **caracterizado pelo** fato de que o

conjugado ou fármaco anticâncer de flavagline é seletivo para células cancerosas no sujeito.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 13, **caracterizado pelo** fato de que o conjugado ou fármaco anticâncer de flavaglina é incorporado em pelo menos cerca de 2 vezes mais células tumorais ou cancerosas do que células saudáveis.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 16, **caracterizado pelo** fato de que o câncer é selecionado de melanoma, câncer cerebral, câncer de pulmão, câncer adrenal, câncer de fígado, câncer renal ou renal, câncer pancreático, câncer de esôfago, câncer gástrico, câncer de estômago, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer anal, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de mama, câncer cervical, linfoma, leucemia, mieloma, câncer hematológico, hepatocarcinoma, retinoblastoma, glioma, sarcoma, blastoma, carcinoma de células escamosas, e adenocarcinoma.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 17, **caracterizado pelo** fato de que o sujeito é humano.

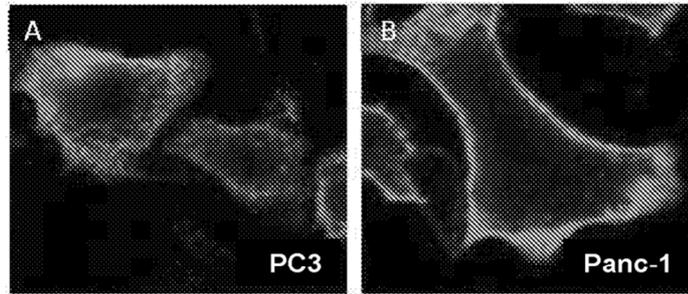


FIG. 1A

FIG. 1B

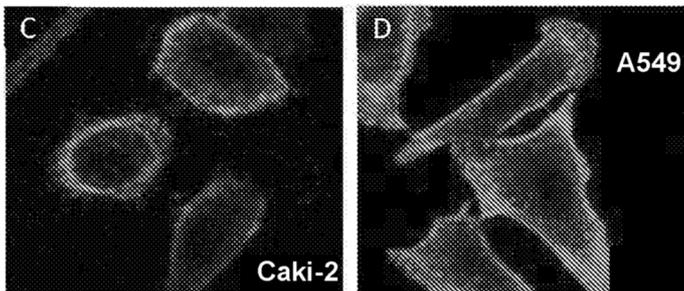


FIG. 1C

FIG. 1D

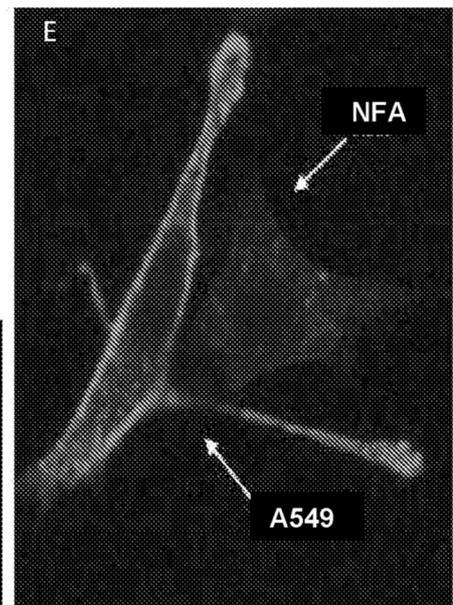


FIG. 1E

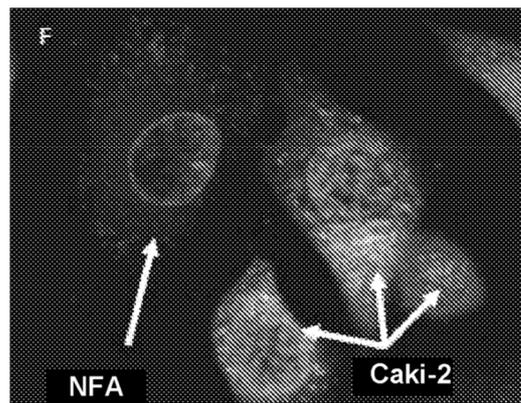


FIG. 1F

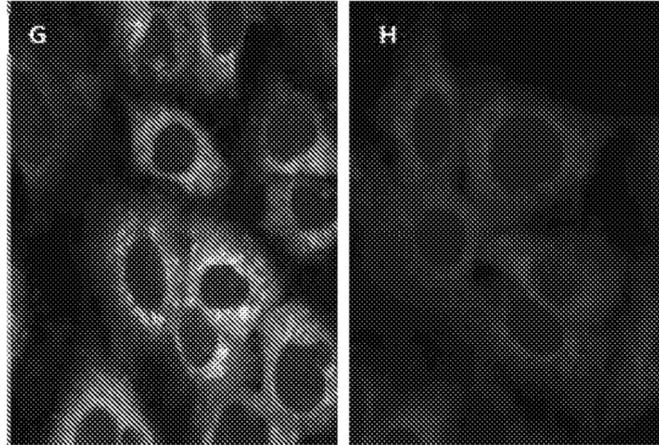


FIG. 1G

FIG. 1H

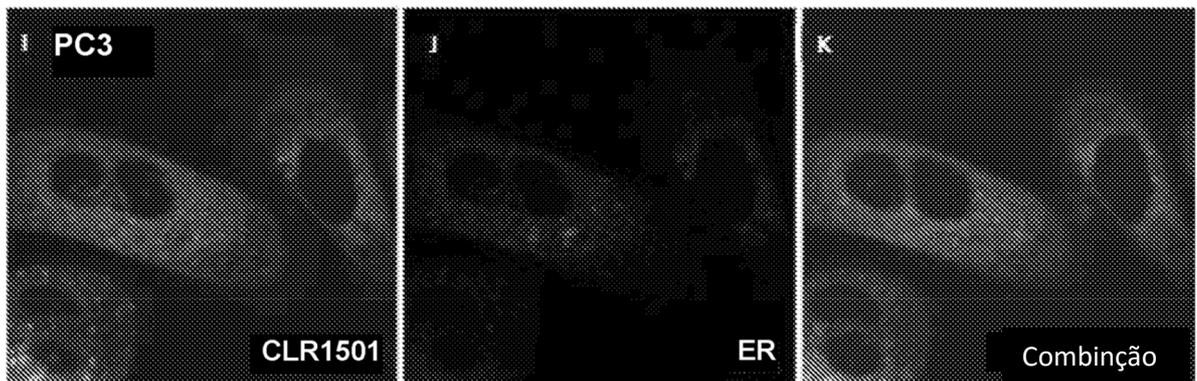


FIG. 1I

FIG. 1J

FIG. 1K

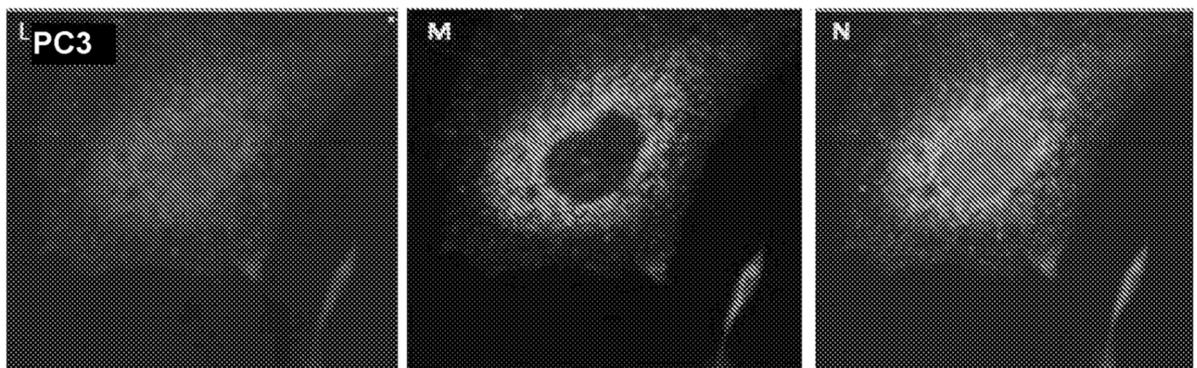


FIG. 1L

FIG. 1M

FIG. 1N

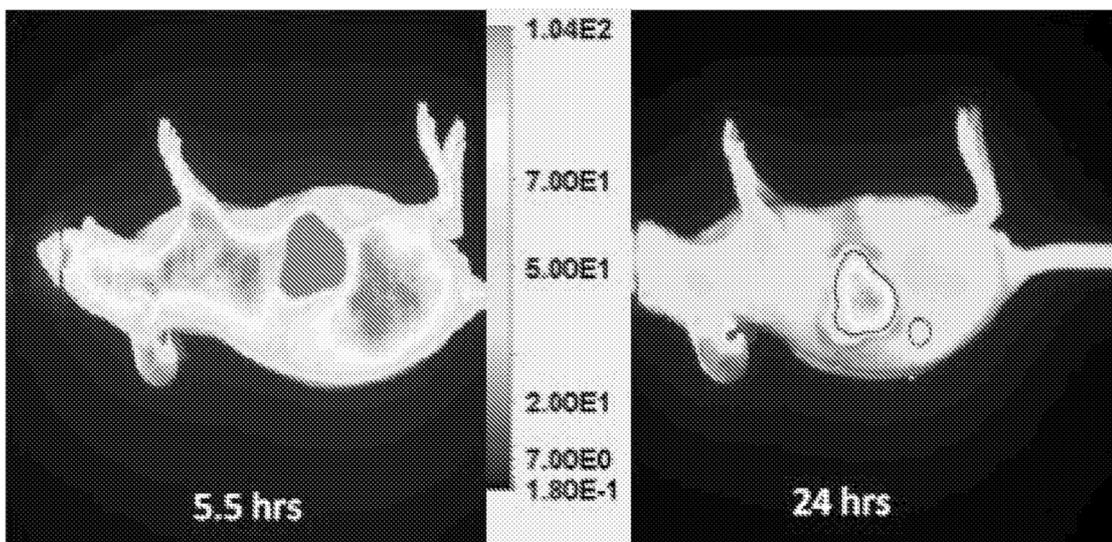


FIG. 2

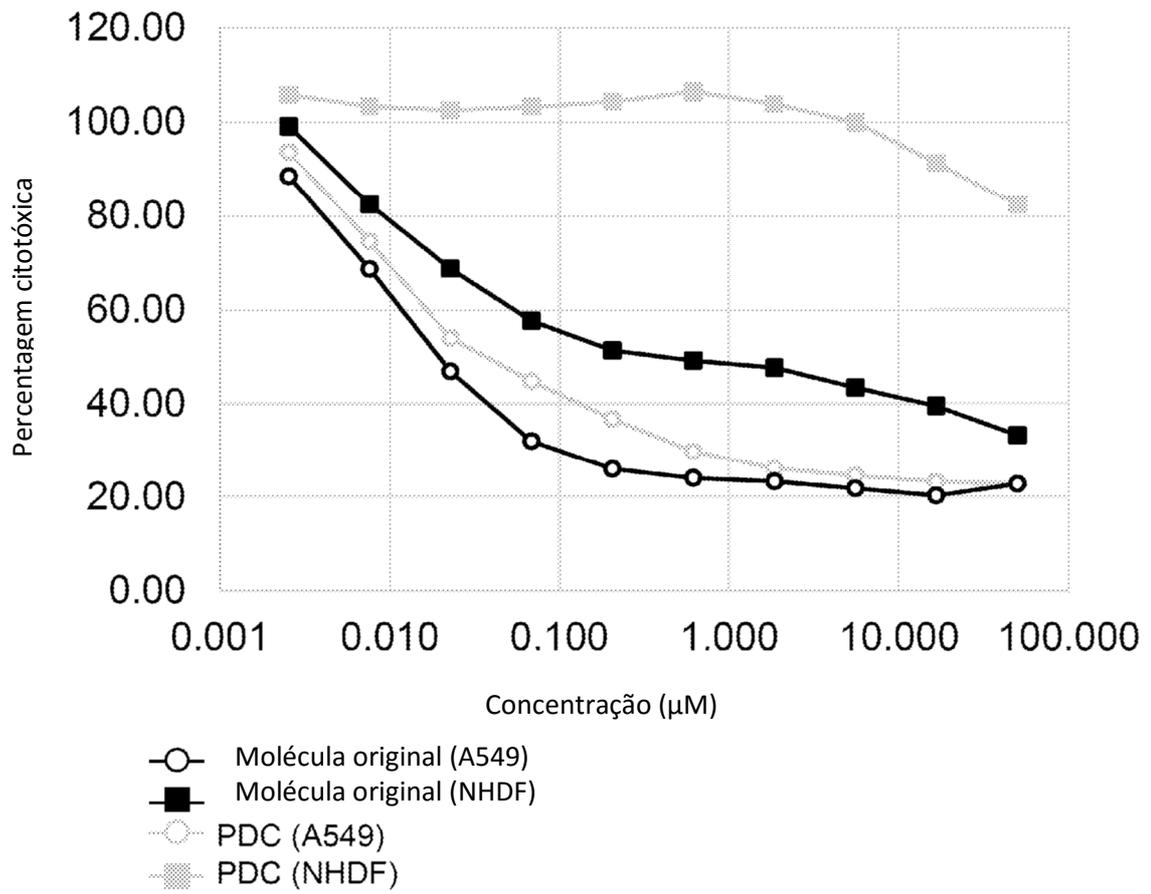


FIG. 3

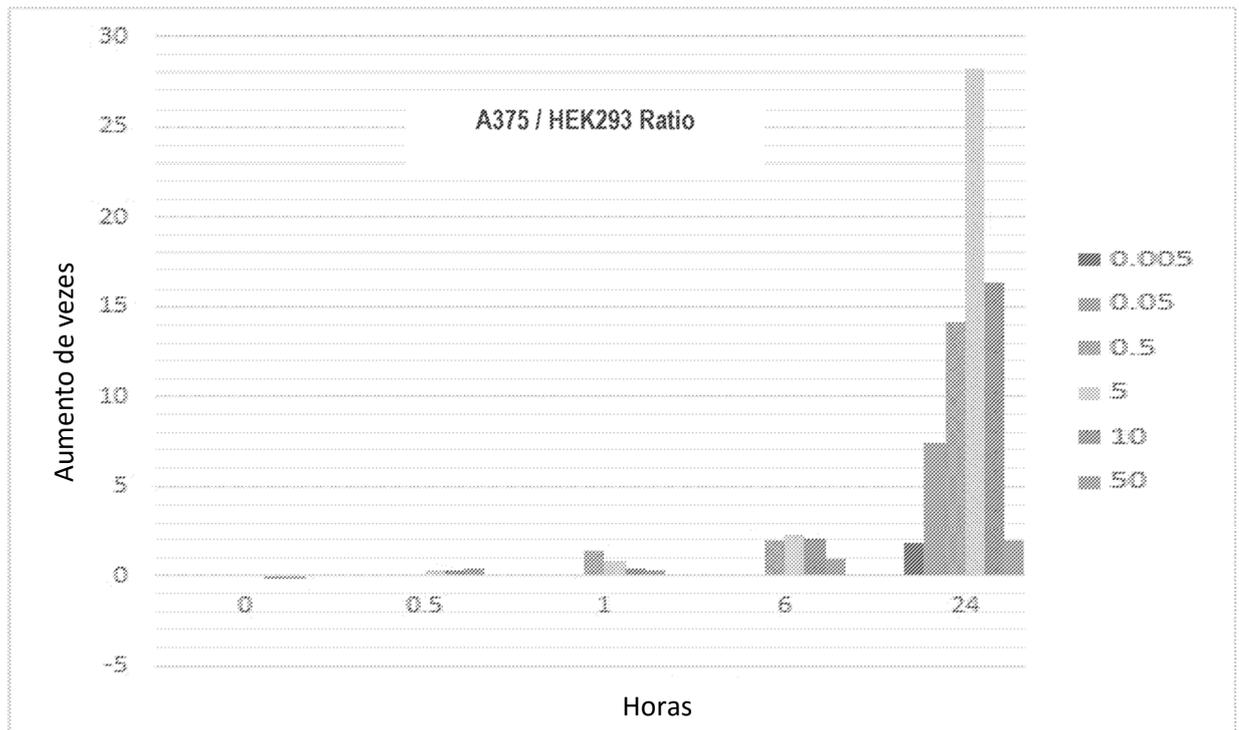


FIG. 4



FIG. 5

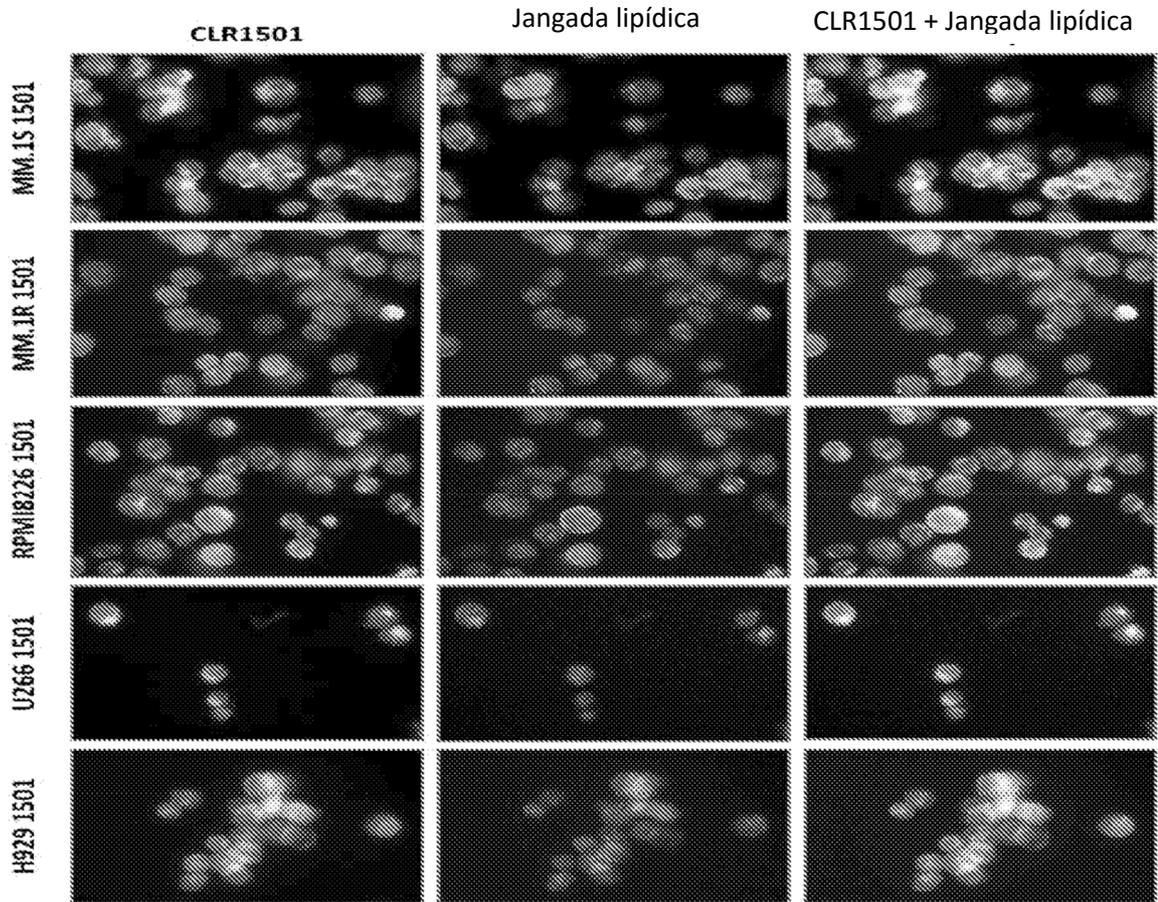


FIG. 6

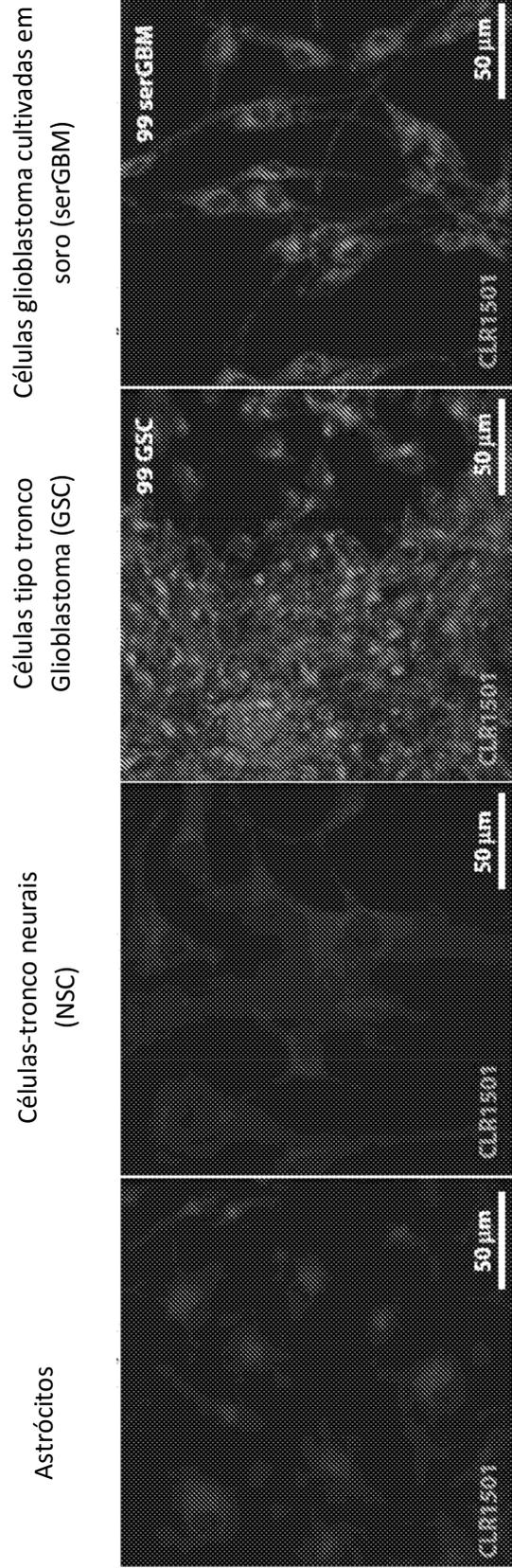


FIG. 7

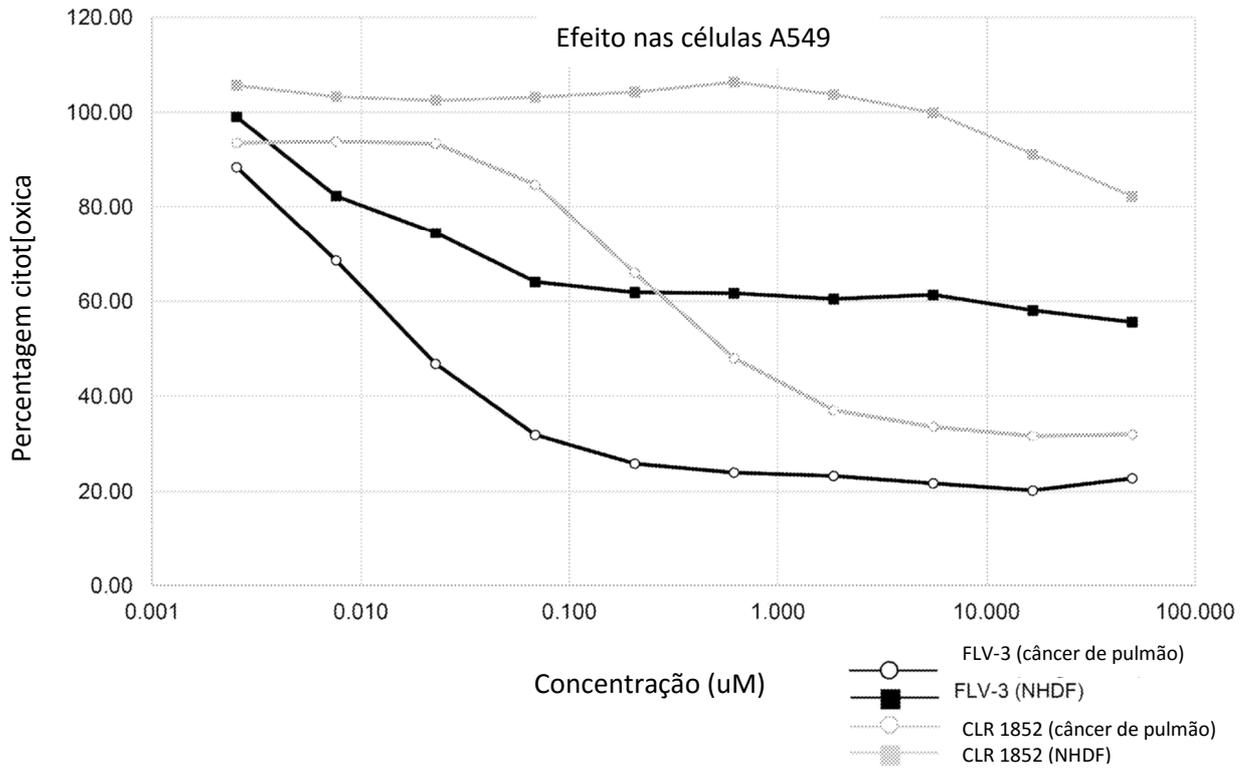


FIG. 8

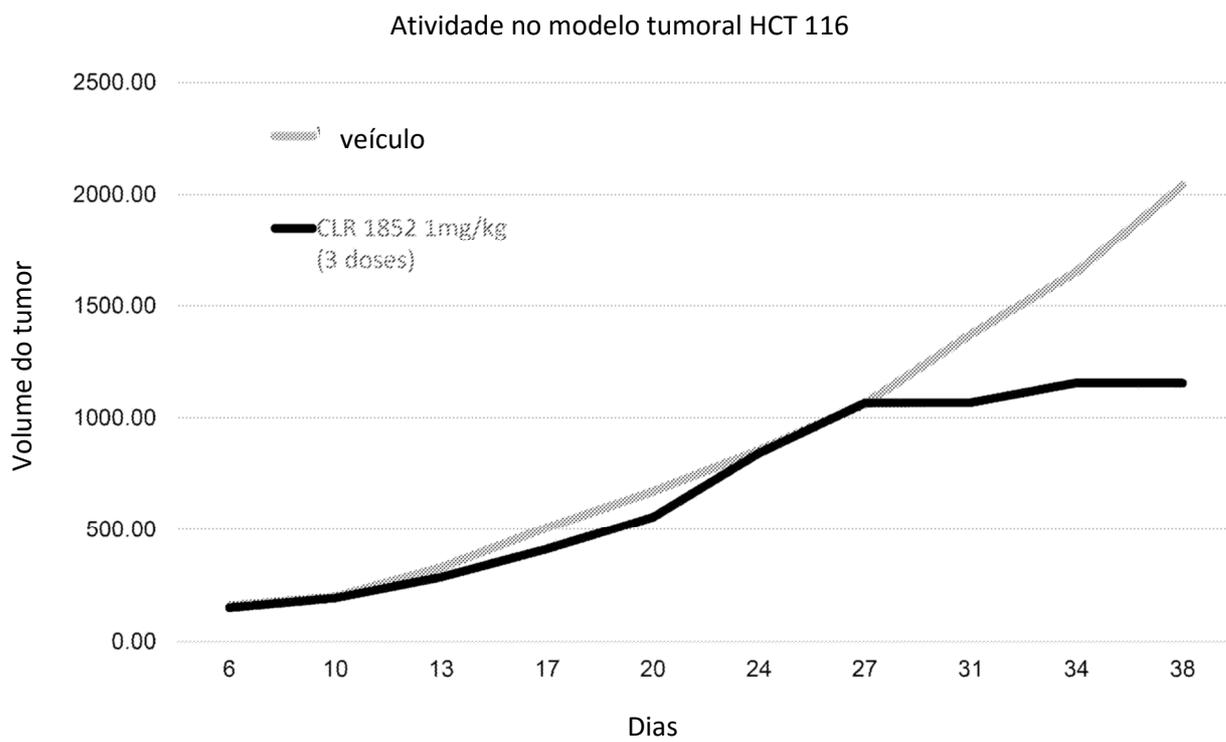


FIG. 9

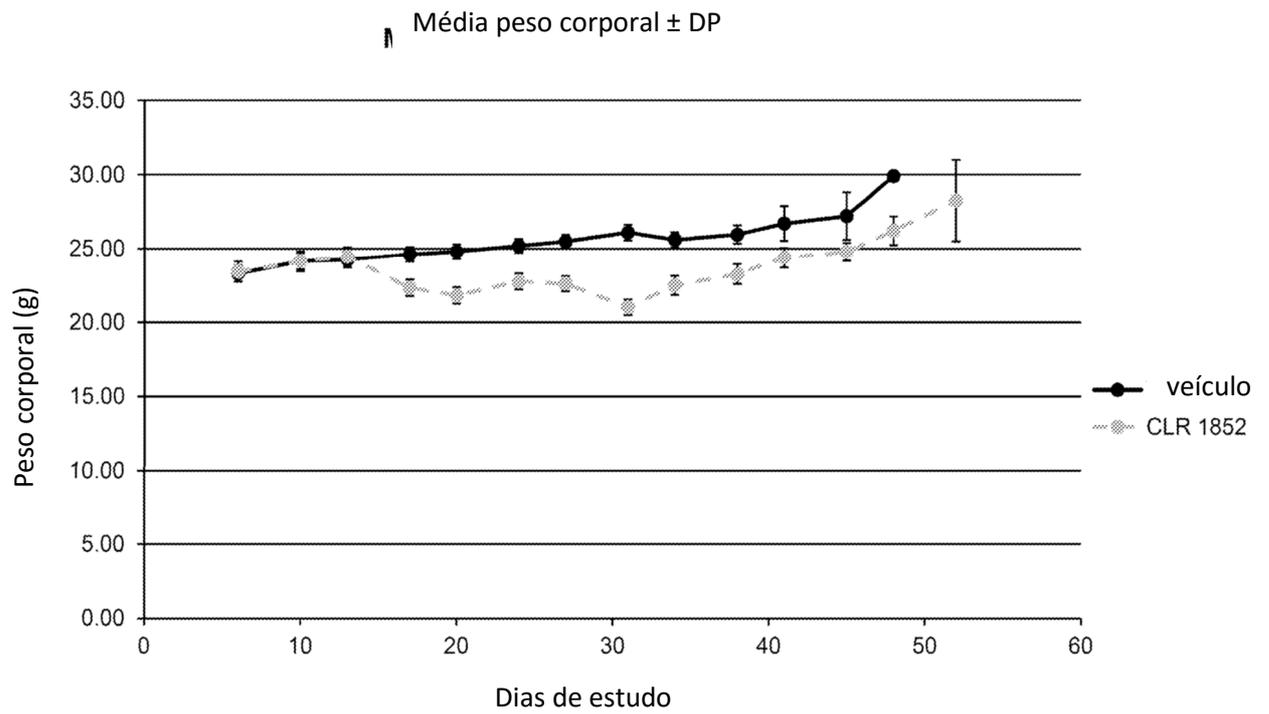


FIG. 10

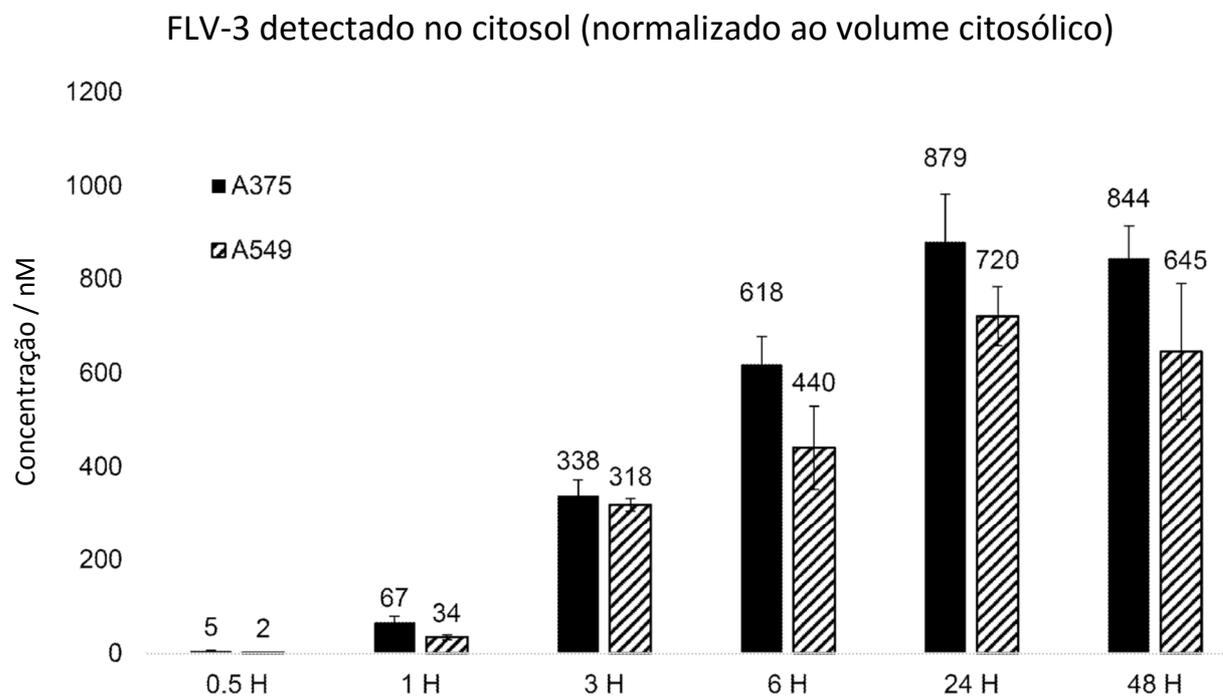


FIG. 11

RESUMO

CONJUGADOS DE FOSFOLIPÍDEOS-FLAVAGLINAS E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO PARA A TERAPIA DIRECIONADA A CÂNCER

São divulgadas aqui moléculas de éter fosfolipídico (PLE). Além disso, são fornecidos os conjugados de fosfolipídeo-flavagina. O conjugado fosfolipídio-flavagina pode incluir um PLE conjugado a uma flavagina por meio de um ligante. São fornecidos aqui métodos de tratamento de câncer em um sujeito e métodos de direcionamento de um fármaco a um tumor ou célula cancerosa em um sujeito.