

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 973**

51 Int. Cl.:

A61K 31/435 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2017 PCT/US2017/035278**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2017 WO17218191**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2017 E 17813776 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2023 EP 3471722**

54 Título: **Compuestos, composiciones y métodos para la prevención y/o el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

17.06.2016 US 201662351599 P
27.07.2016 US 201662367174 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.04.2024

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)**
3600 Civic Center Boulevard, 9th Floor
Philadelphia PA 19104-6283, US

72 Inventor/es:

RIDKY, TODD;
NATALE, CHRISTOPHER y
WINKLER, JEFFREY

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 966 973 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos, composiciones y métodos para la prevención y/o el tratamiento del cáncer

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reclama prioridad a tenor de 35 U.S.C. § 119(e) con respecto a las solicitudes de patente provisionales de EE. UU. n.º 62/351.599, presentada el 17 de junio de 2016 y N.º 62/367.174, presentada el 27 de julio de 2016.

Antecedentes de la invención

El melanoma es la forma más letal de cáncer de piel y se desarrolla a partir de células que contienen pigmentos conocidas como melanocitos. Los melanomas aparecen normalmente en la piel, pero también pueden producirse en la boca, intestinos u ojos. La causa principal del melanoma es el daño al ADN provocado por la exposición a la luz ultravioleta, especialmente en los individuos de piel clara con bajo nivel de pigmento cutáneo (melanina). Una gran fracción de los melanomas se desarrolla a partir de nevos (lunares) preexistentes. Las personas con niveles bajos de pigmento cutáneo basal, numerosos lunares, antecedentes de familiares afectados y una función inmunitaria deficiente, tienen un mayor riesgo de desarrollar melanoma. Hay más de 80.000 casos de melanoma por año en los Estados Unidos. Las opciones de tratamiento son limitadas por el momento, solo el 30 % de los pacientes con metástasis de melanoma sobreviven más de 5 años.

Existe la necesidad en la técnica de compuestos, composiciones y métodos que pueden usarse para prevenir y/o tratar el melanoma y otros cánceres en un sujeto. Tales compuestos, composiciones y métodos deben presentar una eficacia clínica equivalente y/o superior a las terapias contra el cáncer actuales o, alternativamente, aumentar la eficacia de otras terapias contra el cáncer cuando se usan en terapia combinada. La presente invención satisface esta necesidad.

Breve resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Se proporciona el agonista de GPER G-1 en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 para su uso en un método para tratar o prevenir un cáncer que expresa GPCR (del inglés *G protein-coupled receptor*) en un sujeto, en donde el cáncer que expresa GPCR es melanoma. La invención proporciona además una composición que comprende (i) el agonista de GPCR G-1 y (ii) un anticuerpo anti-PD-1. La invención proporciona además un kit que comprende (i) el agonista de GPCR G-1 y (ii) un anticuerpo anti-PD-1 y material instructivo para el uso del mismo en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto, en donde el cáncer es melanoma.

En determinadas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista del receptor acoplado a proteína G (GPCR) que aumenta la diferenciación celular en el cáncer. De acuerdo con la invención, al sujeto se le coadministra además un anticuerpo anti-PD-1.

En determinadas realizaciones, el agonista de GPCR comprende un agonista selectivo del receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER, del inglés *G protein-coupled estrogen receptor*).

De acuerdo con la invención, el cáncer que expresa GPCR es melanoma.

En determinadas realizaciones, el agonista de GPCR y el anticuerpo anti-PD-1 se coadministran al sujeto. En otras realizaciones, el agonista de GPCR y el anticuerpo anti-PD-1 están coformulados.

En determinadas realizaciones, el agonista de GPCR se administra al sujeto como una composición farmacéutica que comprende además al menos un portador farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, al sujeto se le administra además al menos un tratamiento contra el cáncer adicional. En otras realizaciones más, el al menos un tratamiento contra el cáncer adicional comprende quimioterapia, un linfocito T con receptor quimérico para el antígeno (Chimeric Antigen Receptor, CAR) genomodificado, un inhibidor del punto de control inmunitario y/o radioterapia. En otras realizaciones más, la quimioterapia se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), temolozomida, dacarbacina (DTIC), vemurafenib, dabrafenib y trametinib. En otras realizaciones más, el inhibidor del punto de control inmunitario se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de PD-1, inhibidor de PD-L1, inhibidor de CTLA-4, inhibidor de LAG3, inhibidor de IDO(1/2), inhibidor de TIGIT e inhibidor de B7-H3. En otras realizaciones más, el estrógeno o agonista de GPCR se administra al sujeto mediante al menos una vía de administración seleccionada del grupo que consiste en inhalatoria, oral, rectal, vaginal, parenteral, tópica, transdérmica, pulmonar, intranasal, bucal, oftálmica, intratecal, intracraneal e intravenosa. En determinadas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En otras realizaciones, el mamífero es humano.

En determinadas realizaciones, el sujeto tiene el cáncer o se le ha diagnosticado que padece el cáncer. En otras realizaciones, el sujeto no tiene el cáncer o no se le ha diagnosticado que padece el cáncer. En otras realizaciones

más, el estrógeno y/o el agonista de GPCR se administran al sujeto durante un período de 3 semanas o menos. En otras realizaciones, el estrógeno o el agonista de GPCR se administra al sujeto durante un período de 2 semanas o menos. En otras realizaciones más, el estrógeno o el agonista de GPCR se administra al sujeto durante un período de 1 semana o menos.

5

Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada de realizaciones específicas de la invención se entenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. A fin de ilustrar la invención, en los dibujos se representan determinadas realizaciones. Debe entenderse que, sin embargo, la invención no está limitada a las disposiciones precisas e instrumentos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

10

La FIG. 1 es un modelo esquemático no limitante de cómo las hormonas sexuales influyen en la producción normal de pigmentos y/o en el programa de diferenciación de los melanocitos.

15

La FIG. 2 ilustra el equilibrio no limitante de diferenciación y proliferación en condiciones homeostáticas normales, mientras que las células más diferenciadas generalmente se consideran menos oncógenas.

La FIG. 3 es un conjunto de gráficos e imágenes que ilustran el hallazgo de que la exposición de los melanocitos a niveles fisiológicos continuos de estrógeno gestacionales aumenta el estado de diferenciación de los melanocitos, como lo indica el aumento de la producción de pigmento melanina. La exposición transitoria al estrógeno durante sólo cuatro días, a la misma concentración, induce un cambio idéntico en la diferenciación de los melanocitos que es duradero y persiste indefinidamente después de la retirada del estrógeno.

20

Las FIG. 4A-4F ilustran el hallazgo de que la señalización del GPCR ralentiza la proliferación e impulsa la diferenciación en el melanoma humano y de ratón. FIG. 4A: Ensayo de proliferación de 5 días de células B16F10, WM46 (BRAF^{V600E}), WM51 (BRAF^{V600E}) y WM3702 (NRAS^{Q61L}) tratadas con estrógeno (E2), * indica significación mediante una prueba de la T bilateral, n = 3 por grupo. FIG. 4B: Ensayo de melanina de 5 días de células B16F10, WM46 (BRAF^{V600E}), WM51 (BRAF^{V600E}) y WM3702 (NRAS^{Q61L}) tratadas con E2, * indica significación mediante una prueba de la T bilateral, n = 3 por grupo. FIG. 4C: Ensayo de proliferación de 5 días de células B16F10, WM46 (BRAF^{V600E}), WM51 (BRAF^{V600E}) y WM3702 (NRAS^{Q61L}) tratadas con agonista de GPCR (G-1), * indica significación mediante una prueba de la T bilateral, n = 3 por grupo. FIG. 4D: Ensayo de melanina de 5 días de células B16F10, WM46 (BRAF^{V600E}), WM51 (BRAF^{V600E}) y WM3702 (NRAS^{Q61L}) tratadas con G-1, * indica significación mediante una prueba de la T bilateral, n = 3 por grupo. FIG. 4E: Ensayo de proliferación de 3 días de células B16F10 tratadas con una dosis respuesta de G-1, * indica significación de ANOVA unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, n = 5 por grupo. FIG. 4F: Transferencia de Western de células B16F10 tratadas durante 16 horas con una dosis de respuesta saturante de G-1. Todas las barras de error equivalen a la desviación típica de las muestras.

25

30

35

40

La FIG. 5 es un conjunto de gráficos e imágenes que ilustran el hallazgo de que el pretratamiento con estrógeno inhibe el crecimiento de líneas celulares de melanoma *in vivo*.

La FIG. 6 es un gráfico que ilustra el hallazgo de que el tratamiento *in vivo* con G-1 inhibe el crecimiento de la línea celular de melanoma de ratón B16F10 *in vivo*.

45

Las FIG. 7A-7C ilustran el hallazgo de que los embarazos múltiples inhiben la melanomagénesis. FIG. 7 A: Transferencia de Western que valida la transducción de melanocitos humanos normales con BRAF(V600E) inducible por doxiciclina, p53 dominante negativo (R248W), CDK4 activo (R24C) y hTERT. FIG. 7 B: Fotografía representativa de un ratón IDCG con un xenoinjerto de melanoma genomodificado en seres humanos. FIG. 7C: Inmunohistoquímica de MITF en todos los ratones reproductores y no reproductores, * indica duplicados mostrados en la FIG. 1. Barras de escala = 100 µm.

50

Las FIG. 8A-8E ilustran el hallazgo de que los embarazos múltiples inhiben la melanomagénesis e impulsan la diferenciación. FIG. 8 A: Cronología experimental del melanoma de xenoinjerto humano definido genéticamente en ratones IDCG, n = 5 por grupo. FIG. 8B: Caracterización histológica de piel ortotópica representativa y de los tumores resultantes, incluyendo hematoxilina y eosina (H/E), marcadores de melanocitos y proliferación MITF, Ki67/MART y Fontana Masson (Melanina). Barras de escala = 100 µm. Las FIG. 8C-8E: Cuantificación de la tinción epidérmica de MITF (FIG. 8C), índice de proliferación de Ki67 (FIG. 8D) y tinción de melanina en queratinocitos epidérmicos (FIG. 8E), * indica significación por la prueba de Mann-Whitney.

55

60

La FIG. 9 es un conjunto de gráficos de barras que ilustran el hallazgo de que MSH (el equivalente endógeno de la afamelanotida) y la afamelanotida (también conocida como melanotida II o NDP-α-MSH) aumentan la producción de pigmento (parte superior) y la diferenciación (parte inferior) en melanocitos humanos.

65

Las FIG. 10A-10D son un conjunto de gráficos de barras que ilustran el hallazgo de que determinados agonistas de los GPCR de melanocitos asociados a inflamación (CCR10, F2R, PTGER1 y TBXA2R) modulan la síntesis de

melanina en melanocitos humanos. La FIG. 10A demuestra una diferenciación disminuida, mientras que cada una de las FIG. 10B-10D demuestra una diferenciación aumentada.

Las FIG. 11A-11E ilustran el hallazgo de que la señalización GPER impulsa una diferenciación estable en melanocitos humanos normales y en el melanoma. FIG. 11 A: Ensayo de melanina a largo plazo en el que melanocitos humanos normales se trataron transitoriamente con progesterona (P4) o estrógeno (E2). Los subconjuntos de estos grupos (rojo) se trataron con un pulso transitorio adicional de P4 el día 27. Las barras de error equivalen a la desviación típica de las muestras. FIG. 11 B: Transferencia de Western de marcadores de diferenciación de melanocitos tras un tratamiento transitorio de 4 días con vehículo o estrógeno, seguido de un periodo de descanso de 8 días. FIG. 11C: Cronología experimental del pretratamiento con estrógeno o agonista de GPER (G-1) de células de melanoma humano y de ratón, n=5 por grupo. FIG. 11D: Pesos tumorales relativos de melanomas de ratón y humanos pretratados con estrógeno, * indica significación por la prueba de Mann-Whitney. FIG. 11E: Pesos tumorales relativos de melanomas de ratón y humanos pretratados con G-1, * indica significación por la prueba de Mann-Whitney.

La FIG. 12 ilustra el hallazgo de que la señalización de GPER da como resultado la pérdida de c-Myc en el melanoma. Paneles A-C: Transferencias de Western de melanoma de heMel (panel A), de WM46 (panel B) y de B16F10 (panel C) tratados transitoriamente con E2 durante 3 días, seguido de un descanso de 4 días. Grupo D: Transferencia de Western de células WM46 tratadas con un agonista de GPER específico (G-1) durante 16 horas. Grupo E: Transferencia de Western de células WM46 transducidas con luciferasa o c-Myc tratadas con G-1 durante 16 horas. Grupo F: Transferencia de Western de células WM46 tratadas con G-1 a lo largo del tiempo. Grupo G: Transferencia de Western de células WM46 tratadas con G-1, inhibidor de PKA Rp-8-Br-cAMPS (PKAi) 100 μ M, o ambos durante 1 hora. Panel H: Transferencia de Western de células WM46 tratadas con G-1, inhibidor del proteasoma (MG132) 2,5 μ M o ambos durante 1 hora. Grupo I: Transferencia de Western de células WM46 tratadas con ciclohexamida (CHX) 10 μ g/ml con y sin G-1.

Las FIG. 13A-13G ilustran el hallazgo de que la activación transitoria de GPER inhibe la proliferación y aumenta la respuesta a la inmunoterapia en el melanoma. Las FIG. 13A-13C: Transferencias de Western de células de melanoma B16F10 (FIG. 13A), WM46 (FIG. 13B) y YUMM 1.7 (FIG. 13C) tras el tratamiento transitorio con una concentración gestacional de E2 (25 nM) o una concentración optimizada de G-1 (500 nM). FIG. 13D: Cronograma experimental del pretratamiento con vehículo o G-1 de células B16F10 seguido del tratamiento con anticuerpo α PD-1 o control de isotipo de anticuerpo (2A3), n = 5 por grupo. FIG. 13E: Volúmenes tumorales de los grupos de tratamiento el día 14, * indica significación de ANOVA unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. FIG. 13F: Curva de supervivencia de ratones con tumores pretratados con vehículo o G-1, seguido del control de isotipo de anticuerpo (2A3) o anticuerpo α PD-1. La significación entre grupos mediante la prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox) se enumera en la siguiente tabla. FIG. 13G: Transferencia de Western de células WM46 transducidas con luciferasa o c-Myc tratadas con G-1 durante 16 horas.

Las FIG. 14A-14F ilustran el hallazgo de que el tratamiento de ratones portadores de melanoma con inmunoterapia de G-1 y α PD-1 extiende notablemente la supervivencia. FIG. 14 A: Cronología experimental de ratones portadores de B16F10 tratados con vehículo o G-1, así como anticuerpo α PD-1 o control de isotipo de anticuerpo (2A3), n = 10 por grupo. FIG. 14 B: Volúmenes tumorales de los grupos de tratamiento el día 14, * indica significación de ANOVA unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. FIG. 14C: Curva de supervivencia de ratones tratados con vehículo o G-1, así como control de isotipo de anticuerpo (2A3) o anticuerpo α PD-1. La significación entre grupos mediante la prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox) se enumera en la siguiente tabla. FIG. 14D: Esquema experimental de ratones portadores de YUMM1.7 tratados con vehículo o G-1, así como control de isotipo de anticuerpo (2A3) o anticuerpo α PD-1. El tratamiento se inició el día 14 después de que los tumores alcanzaron los 4-5 mm de diámetro, n = 5 por grupo. FIG. 14E: Volúmenes tumorales a lo largo del tiempo de los grupos de tratamiento. FIG. 14F: Curva de supervivencia de ratones tratados con vehículo o G-1, así como anticuerpo α PD-1 o control de isotipo de anticuerpo (2A3). La significación entre grupos mediante la prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox) se enumera en la tabla de la FIG. 14F.

Las FIG. 15A-15C ilustran el hallazgo de que el tratamiento con G-1 *in vivo* altera las células inmunitarias infiltrantes de tumor. FIG. 15 A: Cronograma experimental para el tratamiento con vehículo o G-1 de ratones portadores de melanoma YUMM 1.7. FIG. 15 B: Gráfico cromático que resume el perfil inmunitario en duplicados biológicos, n = 5 por grupo, * indica significación mediante ANOVA bidireccional suponiendo que cada población inmunitaria es una medida independiente de la activación inmunitaria. FIG. 15C: Cuantificación de las poblaciones inmunitarias individuales de la FIG. 15B, n = 5 por grupo.

Las FIG. 16A-16C ilustran el hallazgo de que el tratamiento con G-1 impulsa la acetilación de histonas y presenta sinergia con inhibidores de la HDAC en el melanoma. FIG. 16 A: Espectrometría de masas de melanocitos humanos normales tratados transitoriamente con estrógeno, los puntos de datos rojos (*) indican acetilaciones de histonas significativamente reguladas al alza por CBP/p300. FIG. 16 B: Transferencia de Western de p-RB, c-Myc y H3K56ac en células de melanoma después del tratamiento con G-1, HDACi, o en combinación. FIG. 16C: Ensayo de proliferación de células de melanoma B16F10 después del tratamiento con G-1, HDACi, o en combinación.

Las FIG. 17A-17D ilustran el hallazgo de que la señalización de GPER reduce la proliferación de células de adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) *in vitro* e *in vivo*. FIG. 17 A: Transferencia de Western de c-Myc en varias líneas celulares de ADP tratadas con G-1 500 nM durante 1 hora. FIG. 17 B: Ensayo de proliferación de varias líneas celulares de ADP tratadas con G-1 500 nM durante 5 días. FIG. 17C: Cronograma experimental para el tratamiento con vehículo o G-1 de ratones portadores de tumores de ADP. FIG. 17D: Pesos tumorales de ratones portadores de tumores de ADP tratados con vehículo o G-1.

Las FIG. 18A-18G ilustran el hallazgo de que la señalización de GPER reduce la proliferación de células de CPNM *in vitro* e *in vivo* y tiene efectos combinatorios con la inmunoterapia de α PD-1. FIG. 18 A: Transferencia de Western para pCREB de células LLC1 tratadas con G-1 500 nM durante 30 minutos. FIG. 18 B: Ensayo de proliferación de LLC1 tratado con G-1 500 nM durante 6 días. FIG. 18C: Transferencia de Western para c-Myc de células LLC1 tratadas con G-1 500 nM durante 6 días. FIG. 18D: Transferencia de Western para c-Myc de células LLC1 tratadas con G-1 500 nM a lo largo del tiempo. FIG. 18E: Transferencia de Western para pCREB y c-Myc de células TC-1 tratadas con G-1 500 nM durante 1 hora. FIG. 18F: Volúmenes tumorales a lo largo del tiempo de ratones portadores de tumores de LLC1 tratados con vehículo o G-1, así como anticuerpo α PD-1 o control de isotipo de anticuerpo (2A3). FIG. 18G: Curva de supervivencia de ratones tratados con vehículo o G-1, así como anticuerpo α PD-1 o control de isotipo de anticuerpo (2A3). La significación entre grupos mediante la prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox) se enumera en la siguiente tabla.

La FIG. 19 es una imagen de una transferencia Western obtenida con células de melanoma WM46 tratadas con dosis crecientes de G-1. Los datos muestran una reducción en los niveles de pRB y c-myc, y una elevación de la expresión de GPER, en respuesta a concentraciones crecientes del agonista de GPER G-1.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y se refiere a la combinación del agonista de GPER G-1 y un anticuerpo anti-PD-1. Además, se refiere al descubrimiento inesperado de que los estrógenos y/o los agonistas del receptor acoplado a proteína G (GPCR) de molécula pequeña aumentan la diferenciación de los melanocitos y pueden usarse para prevenir y/o tratar un cáncer que expresa GPCR (tal como uno que expresa GPER) y/o que expresa Myc, tal como, pero sin limitación, melanoma, cáncer de páncreas y/o cáncer de pulmón no microcítico, en un sujeto. En determinadas realizaciones, el GPCR es el receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER), el receptor de melanocortina (MC1R) u otros GPCR que activan sucesos de señalización aguas abajo similares.

La proteína Myc es un factor de transcripción que activa la expresión de varios genes por la unión a secuencias de la caja potenciadora y/o reclutando histona acetiltransferasas. Myc también puede actuar como represor transcripcional, inhibiendo la expresión de determinados genes diana. Myc tiene un papel directo en el control de la replicación del ADN, la proliferación celular, la diferenciación, la invasión del cáncer, la angiogénesis, la supervivencia celular y el escape de células cancerosas de la vigilancia inmunitaria. Myc se expresa en muchos tipos de cáncer y es funcionalmente importante. Se trata, por tanto, de una diana terapéutica biológicamente atractiva. Sin embargo, dirigirse a Myc con compuestos farmacológicos ha sido extremadamente difícil y ningún fármaco para el cáncer aprobado actualmente tiene directamente a Myc como diana.

Myc se activa mediante diversas señales mitogénicas, tales como la estimulación sérica, o por Wnt, Shh y EGF (a través de la vía de MAPK/ERK). Myc es una proteína oncogénica fuerte que a menudo se encuentra regulada al alza en muchos tipos de cánceres, tales como melanoma, linfoma de Burkitt, leucemia, sarcoma, linfoma, mieloma múltiple, cáncer cerebral, neuroblastoma, meduloblastoma, astrocitoma, glioblastoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de tiroides, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de riñón, cáncer de vejiga y/o cáncer de vesícula biliar.

Los melanocitos, que son las células de origen del melanoma, y muchos otros tipos de células humanas, expresan el del receptor de hormona esteroide no canónico receptor de estrógeno acoplado a proteína G 1 (GPER1). Como se demuestra en el presente documento, se descubrió que la activación del GPER en melanocitos mediante estrógeno o un agonista (G-1) específico de GPER selectivo no limitante ilustrativo aumenta el estado de diferenciación de los melanocitos humanos. Al hacerlo, los agonistas de GPER inhiben la capacidad de los melanocitos para proliferar, aumentan su producción de pigmento melanina y de proteínas antigénicas de diferenciación de melanocitos (FIG. 1) y disminuyen su capacidad para formar un cáncer. Esto refleja el hecho de que generalmente se piensa que la diferenciación y la proliferación están en equilibrio en condiciones normales, en que los melanocitos más diferenciados son menos oncógenos (FIG. 2).

En un aspecto, la invención se refiere al descubrimiento inesperado de que los estrógenos y/o los agonistas de GPCR (tales como agonistas selectivos de GPER, tales como G-1) pueden usarse para tratar y/o prevenir no sólo cánceres que clásicamente son sensibles al estrógeno e incluso otras hormonas sexuales (por ejemplo, cánceres que se desarrollan en un tejido reproductivo, tal como, pero sin limitación, un cáncer mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata y/o cáncer de endometrio), sino también cualquier cáncer en que las células cancerosas expresen GPER

o cualquier otro GPCR, tales como, entre otros, un cáncer que expresa Myc. Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, el estrógeno y/o el agonista del GPCR se une al GPCR, provocando una regulación a la baja de Myc en la célula cancerosa. Como se muestra en la FIG. 19, el tratamiento de una célula que expresa GPER con estrógeno o agonista de GPCR (tal como G-1 como agonista selectivo de GPER) provoca un marcado empobrecimiento de la proteína Myc y un aumento inesperado de la proteína GPER. Este aumento en el propio GPER sensibiliza aún más a la célula cancerosa a los efectos del G-1 y/u otros agonistas del GPCR.

Como se muestra en el presente documento, las células de melanoma de ratón y humano respondieron de manera similar al estrógeno, lo que ralentiza la proliferación de las células tumorales. Las células de melanoma humano y de ratón tratadas con estrógeno o el agonista sintético específico de GPER G-1, crecieron más lentamente en ratones y formaron tumores significativamente más pequeños (FIG. 5-6). Una breve exposición única al estrógeno o al G-1 fue suficiente para que se observara el efecto antitumoral. Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, la exposición transitoria al estrógeno fue suficiente para inducir la memoria epigenética que mantiene a las células en un estado más diferenciado. Los datos citados en el presente documento muestran que los melanocitos tratados transitoriamente con estrógeno mantienen la expresión al alza de muchos de los principales marcadores de diferenciación de melanocitos, incluyendo tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa, MC1R, Melan-A y dopacromo tautomerasa (FIG. 3).

Este descubrimiento ayuda a explicar la observación clínica de que las mujeres con melanoma generalmente tienen un mejor pronóstico que los hombres con tumores por lo demás idénticos. Además, las mujeres que han tenido embarazos anteriores y, por tanto, estuvieron expuestas a altas concentraciones del estrógeno agonista de GPER, tienen un mejor pronóstico cuando se les diagnostica un melanoma que las mujeres de la misma edad que nunca han tenido hijos, y esta protección aumenta con el número de embarazos anteriores. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, esto sugiere que las influencias hormonales del embarazo reducen el riesgo de melanoma.

En determinados aspectos, el tratamiento (incluido el tratamiento transitorio) con estrógeno, G-1 o cualquier otro agonista de GPCR (tal como un agonista selectivo de GPER), disminuye el riesgo de melanoma a largo plazo tanto en mujeres como en hombres. De acuerdo con los métodos de la invención, los efectos beneficiosos antimelanoma del embarazo se pueden captar en ambos sexos sin tener que soportar un embarazo real.

En determinados aspectos, el tratamiento con agonistas de GPCR de un paciente con melanoma ayuda a ralentizar el crecimiento tumoral y prolongar la supervivencia global.

En determinados aspectos, se trata a los sujetos además con un inhibidor de la histona desacetilasa, tal como, entre otros, ácido valproico, vorinostat (SAHA), romidepsina, tricotostatina A (TSA), JQ1 u otros inhibidores dirigidos a bromodominios. Estos compuestos potencian inesperadamente los efectos de los agonistas de GPCR, incluyendo G-1 como agonista selectivo de GPER.

En determinados aspectos, se trata a los sujetos además con un tratamiento contra el cáncer, tal como, pero sin limitación, quimioterapia, un linfocito T con receptor quimérico para el antígeno (CAR) genomodificado, cualquier agente de inmunoterapia (tal como un inhibidor del punto de control inmunitario) y/o radioterapia. Los CAR dirigidos a células de melanoma pueden basarse en un ectodominio de proteínas que incluyen, pero no limitado a, MC1R, HGFR (Met), MART-1, VEGFR, gangliósido GD3, GP100, tirosinasa y NY-ESO-1. También se contemplan dentro de la invención vacunas dirigidas contra proteínas de diferenciación, tales como, pero sin limitación, MC1R, MART, TYR y/o DCT.

La terapia de punto de control inmunitario (tal como, pero no limitado a, inhibidores dirigidos a PD-1 y/o CTLA4) actúa activando linfocitos T citotóxicos que reconocen antígenos en las células tumorales. Estos antígenos en el melanoma suelen incluir marcadores de diferenciación de melanocitos (tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa, MC1R, Melan-A y dopacromo tautomerasa). El tratamiento de un sujeto con estrógeno, G-1 o cualquier otro agonista de GPCR (tal como un agonista de GPER) aumenta la expresión de estas proteínas antigénicas. En determinadas realizaciones, el tratamiento de un sujeto con estrógeno y/o un agonista de GPER aumenta la eficacia de la inmunoterapia, incluidos los regímenes habituales actuales con inhibidores del punto de control inmunitario y/o vacunas dirigidas contra proteínas de diferenciación.

En determinadas realizaciones, los sujetos con riesgo aumentado de melanoma (por ejemplo, sujetos con apariciones previas de melanoma, antecedentes familiares de melanoma y/o un receptor de trasplante), o cualquier otro tipo de cáncer que exprese GPCR (tal como un cáncer que expresa GPER) y/o que expresa Myc, pueden beneficiarse del tratamiento con estrógenos y/o un agonista de GPCR (tal como un agonista selectivo de GPER). En otras realizaciones, un sujeto en general puede beneficiarse del tratamiento con estrógenos y/o un agonista de GPCR (tal como un agonista selectivo de GPER), que actúa como tratamiento preventivo o de mantenimiento contra futuras apariciones de un cáncer que expresa GPCR (tal como un cáncer que expresa GPER) y/o que expresa Myc. En otras realizaciones más, los pacientes con cáncer actuales pueden beneficiarse del tratamiento con estrógenos y/o un agonista de GPCR (tal como un agonista selectivo de GPER), ya sea solo, en combinación con una HDAC y/o en combinación con cualquier otra terapia, incluyendo, pero no limitado a, inmunoterapias (utilizando, por ejemplo, inhibidores del punto de control inmunitario), quimioterapias dirigidas, quimioterapias tradicionales no selectivas o

radioterapia.

En determinadas realizaciones, el agonista de GPER de acuerdo con la invención, el compuesto (G-1), se formula para administración oral (por ejemplo, en forma de pastillas), administración intravenosa o intramuscular y/o administración tópica (por ejemplo, cremas tópicas, geles y/o pomadas). En otras realizaciones, el agonista de GPER, es decir, G-1), se utiliza para disminuir la probabilidad de que un lunar benigno (es decir, un nevo melanocítico) se convierta en melanoma.

La presente divulgación no debe interpretarse como limitada al uso de agonistas de GPER en el tratamiento de cánceres que expresan GPCR (tal como uno que expresa GPER) y/o que expresan Myc, tal como, pero sin limitación, melanoma. Además de GPER, los melanocitos y los tumores que surgen en otros tipos de tejidos expresan otros receptores acoplados a proteína G (los GPCR de melanocitos destacados en la Tabla 1) que, cuando se activan, señalizan a través de las mismas vías aguas abajo que GPER para impulsar la diferenciación de manera similar (FIG. 9). En determinados aspectos de la divulgación, los agonistas de estos receptores tienen actividad antitumoral, ya sea solos y/o en combinación con otros agentes terapéuticos, incluidos, pero no limitado a, los productos inmunoterápicos. Los ejemplos no limitantes de tales ligandos de receptores incluyen derivados peptídicos de la MSH tales como afamelanotida, también conocido como melanotida II o NDP- α -MSH. Las FIG. 10A-10D ilustran cómo determinados agonistas de los GPCR de melanocitos de inflamación modulan la síntesis de melanina en melanocitos humanos. Así pues, los agonistas de GPCR que aumentan la diferenciación de melanocitos son útiles en la presente invención. En determinados aspectos de la divulgación, los ejemplos de tales agonistas de GPCR incluyen agonistas hacia MC1R, CYSLTR2, F2R, HRH2, LPAR2/3/6, PTGER1, S1PR₂, S1PR₃ y/o TBXA₂R. En otros aspectos de la divulgación, los ejemplos de tales agonistas de GPCR incluyen agonistas hacia F2R, PTGER1 y/o TBXA₂R. En aun otros aspectos de la divulgación, tales agonistas incluyen afamelanotida (*N*-acetil-L-seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucil-L- α -glutamyl-L-histidil-D-fenilalanil-L-arginil-L-triptofilglicil-L-lisil-L-prolil-L-valinamida), N-metil LTC₄ (ácido N-metil-5S-hidroxi-6R-(S-glutationil)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraenoico), TFLLR-NH₂ (Thr-Phe-Leu-Leu-Arg-NH₂), Impromidinc (2-[3-(1*H*-imidazol-5-il)propil]-1-[2-[(5-metil-1*H*-imidazol-4-il)metilsulfanil]etil]guanidina), Carbacol (2-[(Aminocarbonil)oxi]-*N,N,N*-cloruro de trimetil etanaminio), Sulprostona ((Z)-7-[(1R,3R)-3-hidroxi-2-[(E,3R)-3-hidroxi-4-fenoxibut-1-enil]-5-oxociclopentil]-N-metilsulfonilhept-5-enamida), FTY720 (clorhidrato de 2-amino-2-[2-(4-octil-fenil)-etil]-propano-1,3-diol o clorhidrato de Fingolimod) y U46619 (ácido (E)-7-[(1R,4R,5S,6R)-6-((S,Z)-3-hidroxi-1-en-1-il)-2-oxabicyclo[2.2.1]heptan-5-il)hept-5-enoico).

Tabla 1. Los GPCR de melanocitos que propician la diferenciación celular y la producción de pigmento melanina cuando se activan mediante ligandos naturales o sintéticos.

Receptor	Ligando natural	Proteína G	Agonista	Antagonista
MC1R	α -MSH	G _s	afamelanotida	
CCR10	CCL27	G _i	N/E	N/E
CYSLTR2	Cisteinil-leucotrieno	G _q	N-metil LTC ₄	Pranlukast
F2R	Trombina	G _{q/11} , G _i y G _{12/13}	TFLLR-NH ₂	Vorapaxar
HRH2	Histamina	G _s	Impromidina	Nizatidina
LPAR2/3/6	Ácido lisofosfatídico	G _q G _i	Carbacol	dioctilglicerol
PTGER1	Prostaglandina E2	G _q	Sulprostona	SC19220
S1PR ₂ , S1PR ₃	Esfingosina-1-fosfato	G _q G _i	FTY720	JTE-013
TBXA ₂ R	Tromboxano A2	G _q	U46619	ICI 185.282

Definiciones

Como se usa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con él en este apartado.

A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen generalmente el mismo significado que el que entiende normalmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, la genética molecular y la química son las bien conocidas y comúnmente empleadas en la técnica.

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" lo entenderán las personas con conocimientos habituales en la técnica y variará hasta cierto punto según el contexto en el que se utilice. Como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y

similares, el término "aproximadamente" pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, o $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

5 Como se usa en el presente documento, el término "alcoxi" empleado solo o en combinación con otros términos significa, a menos que se indique otra cosa, un grupo alquilo que tiene el número designado de átomos de carbono, como se define en otra parte en el presente documento, conectado al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, tal como, por ejemplo, metoxi, etoxi, 1-propoxi, 2-propoxi (o isopropoxi) y los homólogos e isómeros superiores. Un ejemplo específico es alcoxi(C₁-C₃), tal como, pero no limitado a, etoxi y metoxi.

10 Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" por sí mismo o como parte de otro medio sustituyente, a menos que se indique otra cosa, un hidrato de carbono de cadena lineal o ramificada que tiene el número de átomos de carbono designado (es decir, C₁-C₁₀ significa de uno a diez átomos de carbono) e incluye cadenas rectas, ramificadas o grupos sustituyentes cíclicos. Los ejemplos incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *terc*-butilo, pentilo, neopentilo, hexilo y ciclopropilmetilo. Una realización específica es alquilo(C₁-C₄), tal como, pero
15 no limitado a, etilo, metilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *t*-butilo y ciclopropilmetilo.

Una "enfermedad" es el estado físico de un animal en donde el animal no puede mantener la homeostasis y en donde si la enfermedad no mejora, la salud del animal continúa deteriorándose. En cambio, un "trastorno" en un animal es un estado físico en el que el animal puede mantener la homeostasis, pero en el que el estado físico del
20 animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si se deja sin tratar, un trastorno no necesariamente provoca una disminución adicional en la salud del animal.

"Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una cantidad de un compuesto, formulación, material o composición, como se describe en el presente documento, eficaz para lograr un resultado biológico particular o proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico. Dichos resultados pueden incluir, pero sin limitación, actividad antitumoral determinada por cualquier medio
25 adecuado en la técnica.

30 Como se usa en el presente documento, "endógeno" se refiere a cualquier material de o producido dentro de un organismo, una célula, tejido o sistema.

"Estrógeno" o "estrógenos" como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier sustancia, natural o sintética (incluidos análogos y derivados de estrógenos), que imita el efecto de la hormona natural, el estrógeno. Los tipos de estrógeno incluyen, pero sin limitación, estrone (E1), estradiol (E2), estriol (E3), estetrol (E4), 17 β -estradiol, 27-hidroxicolesterol, dehidroepiandrosterona (DHEA), 7-oxo-DHEA, 7 α -hidroxi-DHEA, 16 α -hidroxi-DHEA, 7 β -
35 hidroxiandrostero, Δ^4 -androstenediona, Δ^5 -androstenediona, 3 α -androstanol, 3 β -androstanol, 2-hidroxiestrone, 16-hidroxiestrone, cipionato de estradiol, valerato de estradiol, acetato de estradiol, benzoato de estradiol, etinilestradiol (EE), mestranol, moxestrol, quínestrol, dietilestilbestrol bencestrol, dienestrol, acetato de dienestrol, dipropionato de dietilestilbestrol, fosfestrol, hexestrol, dipropionato de metestrol, xenoestrógenos, fitoestrógenos y/o micoestrógenos.
40

Como se usa en el presente documento, el término "halo" o "halógeno" solo o como parte de otro sustituyente se refiere a, a menos que se indique otra cosa, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo.

45 Como se usa en el presente documento, el término "GPCR" se refiere a un receptor acoplado a proteína G.

Como se usa en el presente documento, el término "GPER" se refiere a un receptor de estrógeno acoplado a proteína G, que es un tipo de GPCR.

50 Como se usa en el presente documento, un "material instructivo" incluye una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos de la invención. El material de formación del kit de la invención puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición de la invención o enviarse junto con un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición. Como alternativa, el material instructivo puede enviarse por separado del
55 recipiente con la intención de que el material de instructivo y el compuesto se utilicen cooperativamente por el receptor.

Como se usa en el presente documento, "inhibidor del punto de control inmunitario" se refiere a un fármaco (tal como una molécula pequeña, péptido y/o anticuerpo) que desencadena un ataque del sistema inmunitario sobre las
60 células cancerosas. Los ejemplos de inhibidores del punto de control inmunitario incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, inhibidores de PD-1 (es decir, pembrolizumab, Nivolumab, anti-PD-1), inhibidores de PD-L1 (es decir, atezolizumab, anti-PD-L1), inhibidores de CTLA-4 (es decir, ipilimumab, anti-B7-1/B7-2, anti-CTLA-4), inhibidores de indolamina (2,3)-dioxigenasa (IDO 1/2), inhibidores de B7 homólogo 3 (B7-H3), inhibidores del gen de activación de linfocitos 3 (LAG3) y TIGIT (inmunorreceptor de linfocitos T con dominios Ig e ITIM) dirigidos a anticuerpos y
65 agentes.

Por el término "modificado", como se usa en el presente documento, se entiende un estado o estructura cambiados de una molécula o célula de la invención. Las moléculas pueden modificarse de muchas maneras, incluso químicamente, estructuralmente y funcionalmente. Las células pueden modificarse mediante la introducción de ácidos nucleicos.

Por el término "modulación", como se usa en el presente documento, se entiende la mediación de un aumento o disminución detectables en el nivel de una respuesta en un sujeto en comparación con el nivel de una respuesta en el sujeto en ausencia de un tratamiento o compuesto, y/o en comparación con el nivel de una respuesta en un sujeto por lo demás idéntico pero sin tratar. El término abarca perturbar y/o afectar una señal o respuesta natural, por lo tanto, la mediación de una respuesta terapéutica beneficiosa en un sujeto, preferentemente, un ser humano.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer que expresa Myc" se refiere a un tipo de cáncer cuyo origen y/o propagación depende y/o se acelera por la activación, desregulación, mutación y/o función anómala de Myc. Los ejemplos no limitantes de cánceres que expresan Myc incluyen melanoma, linfoma de Burkitt, leucemia, sarcoma, linfoma, mieloma múltiple, cáncer cerebral, neuroblastoma, meduloblastoma, astrocitoma, glioblastoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de tiroides, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de riñón, cáncer de vejiga y cáncer de vesícula biliar.

La administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, por ejemplo, inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) o intraesternal, o técnicas de infusión.

Como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" o "composición" se refiere a una mezcla de al menos un compuesto útil dentro de la invención con otros componentes químicos, tales como portadores, estabilizantes, diluyentes, agentes de dispersión, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o excipientes. La composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un organismo. Existen múltiples técnicas de administración de un compuesto en la técnica que incluyen, pero sin limitación: administración intravenosa, oral, en aerosol, parenteral, oftálmica, pulmonar, intracraneal, transdérmica y tópica. En determinadas realizaciones, la administración comprende administración tópica.

Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material, tal como un portador o diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades de la composición y es relativamente no tóxico, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin provocar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o portador farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, estabilizante, agente dispersante, agente de suspensión, diluyente, excipiente, agente espesante, disolvente o material encapsulante, implicado en portar o transportar un compuesto útil dentro de la invención dentro o al sujeto de modo que pueda realizar su función prevista. Normalmente, tales construcciones son llevadas o transportadas desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación, incluido el compuesto útil dentro de la invención, y no perjudicial para el sujeto. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; agentes tensioactivos; ácido alginico; agua exenta de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones de tampón fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. Como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye también todos y cada uno de los recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y agentes retardantes de la absorción, y similares que sean compatibles con la actividad del compuesto útil dentro de la invención, y sean fisiológicamente aceptables para el sujeto. Además, pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones. El "portador farmacéuticamente aceptable" puede incluir además una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto útil dentro de la invención.

Otros ingredientes adicionales que pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas usadas en la práctica de la invención son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA).

Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal del compuesto administrado preparada a partir de ácidos y/o bases no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos inorgánicos, bases inorgánicas, ácidos orgánicos, bases inorgánicas, solvatos (incluidos hidratos)

y clatratos de los mismos.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad farmacéuticamente eficaz" "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" de un compuesto es la cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al que se administra el compuesto.

El término "prevenir" "previniendo" o "prevención" como se usa en el presente documento significa evitar o retrasar la aparición de síntomas asociados con una enfermedad o afección en un sujeto que no ha desarrollado dichos síntomas en el momento en que comienza la administración de un agente o compuesto. Enfermedad, afección y trastorno se usan indistintamente en el presente documento.

Por la expresión "se unen específicamente" o "se une específicamente" como se usa en el presente documento se entiende que una primera molécula se une preferentemente a una segunda molécula (por ejemplo, un receptor o enzima particular), pero no necesariamente se une sólo a esa segunda molécula.

Se entiende que el término "sujeto" incluye organismos vivos en los que se puede inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, mamíferos). Un "sujeto" o "paciente", como se usa en el mismo, puede ser un mamífero humano o no humano. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, ganado y mascotas, tales como mamíferos ovinos, bovinos, porcinos, cánidos, felinos y murinos. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

Como se usa en el presente documento, una célula "sustancialmente purificada" es una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que se ha separado de otros tipos celulares con los que está normalmente asociada en su estado natural. En determinadas realizaciones, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otras realizaciones, esta expresión se refiere simplemente a una célula que se ha separado de las células con las que está normalmente asociada en su estado natural. En otras realizaciones más, las células se cultivan *in vitro*. En otras realizaciones más, las células no se cultivan *in vitro*.

El término "terapéutico", como se usa en el presente documento, significa un tratamiento y/o profilaxis. Se obtiene un efecto terapéutico mediante supresión, remisión o erradicación de una patología.

Como se usa en el presente documento, "administración tópica" o "aplicación tópica" se refiere a un medicamento aplicado a superficies corporales tales como la piel o las membranas mucosas.

"Tratar" una enfermedad, como se usa el término en el presente documento, significa reducir la frecuencia o gravedad de al menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno experimentado por un sujeto. Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" o "tratar" se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico, es decir, una composición útil dentro de la invención (sola o en combinación con otro agente farmacéutico), a un sujeto, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido o línea celular aislada de un sujeto (por ejemplo, para diagnóstico o aplicaciones *ex vivo*), que tiene una enfermedad o trastorno, un síntoma de una enfermedad o trastorno o el potencial de desarrollar una enfermedad o trastorno, con el fin de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, recuperar, mejorar o afectar a la enfermedad o trastorno, los síntomas de la enfermedad o trastorno o el potencial de desarrollar la enfermedad o trastorno. Dichos tratamientos pueden adaptarse o modificarse específicamente, según el conocimiento obtenido en el campo de la farmacogenómica.

Como se usa en el presente documento, el término "UV" se refiere a ultravioleta.

"Xenogénico" se refiere cualquier material procedente de un animal de una especie diferente.

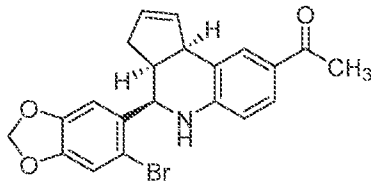
A lo largo de la presente divulgación, se pueden presentar diversos aspectos de la invención en un formato de intervalo. Ha de comprenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad, y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los posibles subintervalos, así como valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha divulgado específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.

Compuestos y composiciones

En un aspecto, la presente invención contempla moléculas pequeñas que se unen y activan un GPCR, tal como el receptor de estrógeno acoplado a proteína G GPER. Esto induce sucesos de señalización celular que aumentan el estado de diferenciación de la célula tumoral. Esto ralentiza la proliferación de las células tumorales, ralentiza el crecimiento global del tumor y hace que las células tumorales sean más visibles para las células inmunitarias y/o susceptibles a la inmunoterapia. En determinadas realizaciones, la presente invención contempla moléculas que sirven como agonistas de otros GPCR. Dichas moléculas inducen la diferenciación celular al activar muchas de las

mismas vías aguas abajo que activa GPER.

El compuesto de acuerdo con la invención es G1 o G-1 (rel-1-[4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-il)-3aR,4S,5,9bS-



tetrahydro-3H-ciclopenta[c]quinolin-8-il]-etanona):

Los compuestos de la invención se pueden preparar de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, métodos conocidos en la técnica y/o métodos descritos en determinadas referencias, tales como, pero sin limitación: publicaciones de solicitud PCT N.º WO 2004/072046 y N.º WO 2016/014847; solicitud de EE. UU. N.º 10/511.083; publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. N.º US 2008/0167334 y US 2011/0092533; y Burai, *et al.*, 2010, *Org. & Biomol. Chem.* 8:2252-2259.

Los compuestos de la invención pueden poseer uno o más estereocentros, y cada estereocentro puede existir independientemente en la configuración (*R*) o (*S*). En determinadas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento están presentes en formas ópticamente activas o racémicas. Los compuestos descritos en el presente documento abarcan formas racémicas, ópticamente activas, regioisoméricas y estereoisoméricas, o combinaciones de las mismas que poseen las propiedades terapéuticamente útiles descritas en el presente documento. La preparación de formas ópticamente activas se logra de cualquier manera adecuada, incluyendo, a modo de ejemplo no limitante, por resolución de la forma racémica con técnicas de recristalización, síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, síntesis quiral o separación cromatográfica utilizando una fase estacionaria quiral. Un compuesto ilustrado en el presente documento mediante la fórmula racémica representa además cualquiera de los dos enantiómeros o mezclas de los mismos, o en el caso en el que estén presentes dos o más centros quirales, todos los diastereómeros o mezclas de los mismos.

En determinadas realizaciones, los compuestos de la invención existen como tautómeros. Todos los tautómeros están incluidos dentro del alcance de los compuestos recitados en el presente documento.

Los compuestos descritos en el presente documento también incluyen compuestos marcados isotópicamente en donde uno o más átomos se sustituyen por un átomo que tiene el mismo número atómico, pero una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos adecuados para su inclusión en los compuestos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{36}Cl , ^{18}F , ^{123}I , ^{125}I , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P y ^{35}S . En determinadas realizaciones, la sustitución por isótopos más pesados, tales como el deuterio, proporciona una mayor estabilidad química. Los compuestos marcados isotópicamente se preparan mediante cualquier método adecuado o mediante procedimientos que utilizan un reactivo marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo no marcado empleado de otro modo.

En determinadas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento están marcados por otros medios, incluyendo, pero no limitado a, el uso de cromóforos o restos fluorescentes, etiquetas bioluminiscentes o etiquetas quimioluminiscentes.

En todas las realizaciones proporcionadas en el presente documento, los ejemplos de sustituyentes opcionales adecuados no pretenden limitar el alcance de la invención reivindicada. Los compuestos de la invención pueden contener cualquiera de los sustituyentes, o combinaciones de sustituyentes, proporcionados en el presente documento.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de la invención y al menos un portador farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, la composición farmacéutica está formulada para administración inhalatoria, oral, rectal, vaginal, parenteral, tópica, transdérmica, pulmonar, intranasal, bucal, oftálmica, intratecal, intracraneal o intravenosa. Todas y cada una de las formulaciones de los compuestos contemplados en la invención se pueden usar para tratar o prevenir un cáncer que expresa GPCR (tal como uno que expresa GPER) y/o que expresa Myc, en donde el cáncer que expresa GPCR es melanoma.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden al menos un agente antineoplásico adicional y al menos un compuesto de la invención. Los ejemplos de agentes antineoplásicos adicionales incluyen, pero sin limitación, quimioterapia e inhibidores del punto de control inmunitario. Los ejemplos no limitantes de quimioterapia incluyen, pero sin limitación, una HDAC, temolozomida, dacarbacina (DTIC), vemurafenib, dabrafenib y trametinib. Los ejemplos no limitantes de inhibidores del punto de control incluyen, pero

sin limitación, inhibidores de PD-1 (es decir, pembrolizumab, Nivolumab, anti-PD-1), inhibidores de PD-L1 (es decir, atezolizumab, anti-PD-L1), inhibidores de CTLA-4 (es decir, ipilimumab, anti-B7-1/B7-2, anti-CTLA-4), inhibidores de la indolamina (2,3)-dioxigenasa (IDO1/2), inhibidores de B7 homólogo 3 (B7-H3), inhibidores del gen de activación de linfocitos 3 (LAG3) y TIGIT (inmunorreceptor de linfocitos T con dominios Ig e ITIM) dirigidos a anticuerpos y agentes.

La presente invención también se refiere a kits útiles dentro de cualquiera de los métodos de la invención descritos en el presente documento. Dichos kits comprenden componentes útiles en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, composiciones y métodos para tratar o prevenir un cáncer que expresa GPCR (tal como uno que expresa GPER) y/o que expresa Myc, en donde el cáncer que expresa GPCR es melanoma, en un sujeto, tal como un ser humano, uno o más recipientes (por ejemplo, tubo de ensayo, frasco de cultivo celular, placa de cultivo celular, matraz de cultivo celular, bolsa de cultivo celular) para contener un componente de cualquiera de las realizaciones de la invención descritas en otra parte del presente documento, y materiales instructivos.

Sales

Los compuestos descritos en el presente documento pueden formar sales con ácidos o bases, y dichas sales están incluidas en la presente invención. El término "sales" abarca sales de adición de ácidos o bases libres que son útiles dentro de los métodos de la invención. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que poseen perfiles de toxicidad dentro de un intervalo que proporciona utilidad en aplicaciones farmacéuticas. En determinadas realizaciones, las sales son sales farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, las sales farmacéuticamente inaceptables pueden poseer propiedades tales como alta cristalinidad, que tienen utilidad en la práctica de la presente invención, tal como, por ejemplo, utilidad en el procedimiento de síntesis, purificación o formulación de compuestos útiles dentro de los métodos de la invención.

Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden prepararse a partir de un ácido inorgánico o de un ácido orgánico. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen sulfato, hidrógenosulfato, ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico (incluyendo hidrógeno fosfato y dihidrógeno fosfato). Los ácidos orgánicos apropiados pueden seleccionarse de ácido alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, aralifáticos, heterocíclicos, carboxílicos y clases sulfónicas de ácidos orgánicos, los ejemplos de los cuales incluyen el ácido fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, 4-hidroxibenzóico, fenilacético, mandélico, embónico (o pamoico), metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, sulfanílico, 2-hidroxietanosulfónico, trifluorometanosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclohexilaminosulfónico, esteárico, alginico, β -hidroxibutírico, salicílico, galactárico, galacturónico, ácidos glicerofosfónicos y sacarina (por ejemplo, sacarinato, sacarato). Las sales pueden estar compuestas por una fracción de uno, de uno o más de un equivalente molar de ácido o base con respecto a cualquier compuesto de la invención.

Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen, por ejemplo, sales de amonio y sales metálicas, incluidas las de metales alcalinos, metal alcalinotérreo y metal de transición, tales como, por ejemplo, sales de calcio, magnesio, potasio, sodio y zinc. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables también incluyen sales orgánicas fabricadas a partir de aminas básicas tales como, por ejemplo, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilenodiamina, meglumina (o N-metilglucamina) y procaina. Todas estas sales pueden prepararse a partir del compuesto correspondiente haciendo reaccionar, por ejemplo, el ácido o base apropiados con el compuesto.

Métodos

La invención proporciona el agonista de GPER G-1 en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 para su uso en un método para tratar o prevenir un cáncer que expresa GPCR (tal como uno que expresa GPER) y/o que expresa Myc, en donde el cáncer que expresa GPCR es melanoma, en un sujeto. En determinadas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del agonista de GPCR que aumenta la diferenciación de células tumorales, mediante el cual el cáncer que expresa GPCR (tal como uno que expresa GPER) y/o que expresa Myc se trata o previene en el sujeto. En determinadas realizaciones, el GPCR es GPER. De acuerdo con la invención, el agonista de GPER es G-1.

En determinadas realizaciones, el agonista de GPCR se administra al sujeto como una composición farmacéutica que comprende además al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

En determinadas realizaciones, al sujeto se le administra además al menos un tratamiento contra el cáncer. Los ejemplos de tratamientos contra el cáncer incluyen, pero sin limitación, quimioterapia, radiación, cirugía y/o inhibidores del punto de control inmunitario. Los ejemplos de quimioterapia incluyen, pero sin limitación, una HDAC, temolozomida, dacarbacina (DTIC), vemurafenib, dabrafenib y trametinib. Los ejemplos de inhibidores del punto de control inmunitario incluyen, pero sin limitación, inhibidores de PD-1 (es decir, pembrolizumab, Nivolumab, anti-PD-1), inhibidores de PD-L1 (es decir, atezolizumab, anti-PD-L1), inhibidores de CTLA-4 (es decir, ipilimumab, anti-B7-

1/B7-2, anti-CTLA-4), inhibidores de la indolamina (2,3)-dioxigenasa (IDO1/2), inhibidores de B7 homólogo 3 (B7-H3), inhibidores del gen de activación de linfocitos 3 (LAG3) y TIGIT (inmunorreceptor de linfocitos T con dominios Ig e ITIM) dirigidos a anticuerpos y agentes. En otras realizaciones, la quimioterapia o el inhibidor del punto de control inmunitario se coadministra o coformula con la combinación reivindicada del agonista de GPCR y el anticuerpo anti-PD-1.

En determinadas realizaciones, el agonista de GPCR se administra al sujeto por vía de administración inhalatoria, oral, rectal, vaginal, parenteral, tópica, transdérmica, pulmonar, intranasal, bucal, oftálmica, intratecal, intracraneal o intravenosa. El cáncer de acuerdo con la invención es melanoma. En otras realizaciones más, el sujeto es un mamífero. En otras realizaciones más, el mamífero es humano. La divulgación proporciona además un método para seleccionar un paciente que padece cáncer que se beneficiará del tratamiento con estrógeno y/o un agonista de GPCR (tal como un agonista selectivo de GPCR). El método comprende obtener una muestra del cáncer del sujeto y determinar si al menos una célula cancerosa de la muestra expresa GPER y/u otro GPCR. La detección y/o cuantificación de GPER y/u otro GPCR en la muestra se puede realizar usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, o cualquier método conocido en la técnica. En determinados aspectos de la divulgación, si la célula cancerosa expresa GPER y/u otro GPCR, se aconseja entonces al sujeto que reciba tratamiento para el cáncer que comprenda estrógeno y/o un agonista selectivo de GPER y/u otro agonista de GPCR, opcionalmente en combinación con al menos un agente inmunoterapéutico y/o inhibidor de HDAC. En otros aspectos de la divulgación, si la célula cancerosa expresa GPER y/u otro GPCR, se le administra entonces al sujeto un tratamiento para el cáncer que comprenda estrógeno y/o un agonista selectivo de GPER y/u otro agonista de GPCR, opcionalmente en combinación con al menos un agente inmunoterapéutico y/o inhibidor de HDAC. En otros aspectos de la divulgación, si la célula cancerosa no expresa GPER y/u otro GPCR, se aconseja al sujeto que no reciba tratamiento para el cáncer que comprenda estrógeno y/o un agonista selectivo de GPER y/u otro agonista de GPCR, opcionalmente en combinación con al menos un agente inmunoterapéutico y/o inhibidor de HDAC. En aun otros aspectos de la divulgación, si la célula cancerosa no expresa GPER, al sujeto no se le administra un tratamiento contra el cáncer que comprenda estrógeno y/o un agonista selectivo de GPER y/u otro agonista de GPCR, opcionalmente en combinación con al menos un agente inmunoterapéutico y/o inhibidor de HDAC.

Formulaciones/Administración

Las cantidades relativas del principio activo, el portador farmacéuticamente aceptable y cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de la invención variarán, dependiendo de la identidad, el tamaño y el estado del sujeto tratado. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre aproximadamente el 0,005 % y aproximadamente el 100 % (p/p) del agente activo, o cualquier fracción o múltiplo del mismo.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas útiles para practicar el método de la invención se pueden administrar para suministrar una dosis de entre 1 ng/kg/día y 100 mg/kg/día, tal como, por ejemplo, 1-50 mg/kg/día. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas útiles para practicar la invención se pueden administrar para suministrar una dosis de entre 1 ng/kg/día y 1.000 mg/kg/día.

La composición que comprende un compuesto contemplado en la invención se puede administrar a un mamífero con una frecuencia de hasta varias veces al día, o se puede administrar con menos frecuencia, tal como una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, o incluso con menos frecuencia, tal como una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos.

Se entiende que la cantidad del compuesto dosificada al día se puede administrar, en ejemplos no limitantes, cada día, en días alternos, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días o cada 5 días. Por ejemplo, con la administración en días alternos, se puede iniciar una dosis de 0,5-5 mg al día el lunes con una primera dosis posterior de 0,5-5 mg al día administrada el miércoles, una segunda dosis posterior de 0,5-5 mg al día administrada el viernes, y así sucesivamente. La frecuencia de la dosis será fácilmente evidente para el experto en la materia y dependerá de una serie de factores, tal como, pero no limitado a, el tipo y gravedad de la enfermedad que se está tratando, el tipo y edad del animal, etc.

Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se dirigen principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para su administración a seres humanos, el experto en la materia entenderá que dichas composiciones son generalmente adecuadas para su administración a animales de todo tipo. La modificación de composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos para hacer que las composiciones sean adecuadas para la administración a diversos animales se comprende bien, y el farmacólogo veterinario experto puede diseñar y realizar dicha modificación con experimentación simplemente ordinaria, si la hubiera. Los sujetos a los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero sin limitación, seres humanos y otros primates, mamíferos, incluidos mamíferos comercialmente importantes tales como ganado vacuno, cerdos, caballos, ovejas, gatos y perros.

En determinadas realizaciones, las composiciones que comprenden un compuesto contemplado dentro de la invención se formulan utilizando uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables. En

determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto contemplado dentro de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables, que son útiles, incluyen, pero sin limitación, glicerol, agua, solución salina, etanol y otras soluciones salinas farmacéuticamente aceptables tales como fosfatos y sales de ácidos orgánicos. Los ejemplos de estos y otros portadores farmacéuticamente aceptables se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (1991, Mack Publication Co., Nueva Jersey).

Las formulaciones pueden emplearse en mezclas con excipientes convencionales, es decir, sustancias vehículo orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para administración oral, parenteral, nasal, intravenosa, subcutánea, intestinal, o cualquier otro modo de administración adecuado, conocido en la técnica. En determinadas realizaciones, la administración comprende administración tópica. Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en los tampones de presión osmótica, sustancias colorantes, saborizantes y/o aromáticas y similares. También se pueden combinar cuando se desee con otros agentes activos, por ejemplo, otros agentes analgésicos.

Como se usa en el presente documento, "ingredientes adicionales" incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes tensioactivos; agentes de dispersión; diluyentes inertes; agentes de granulación y disgregantes; agentes aglutinantes; agentes lubricantes; agentes edulcorantes; agentes saborizantes; agentes colorantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables tales como gelatina; vehículos y disolventes acuosos; vehículos y disolventes oleosos; agentes de suspensión; agentes de dispersión o humectantes; agentes emulsionantes, emolientes; tampones; sales; agentes espesantes; cargas; agentes emulsionantes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables. Se conocen en la técnica otros "ingredientes adicionales" que pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas de la invención y están descritos, por ejemplo, en Genaro, ed. (1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA).

Administración tópica

Un obstáculo para la administración tópica de productos farmacéuticos es la capa de estrato córneo de la epidermis. El estrato córneo es una capa altamente resistente comprendida por proteínas, colesterol, esfingolípidos, ácidos grasos libres y diversos otros lípidos, e incluye células queratinizadas y vivas. Uno de los factores que limitan la tasa de penetración (flujo) de un compuesto a través del estrato córneo es la cantidad de sustancia activa que se puede cargar o aplicar sobre la superficie de la piel. Cuanto mayor sea la cantidad de sustancia activa aplicada por unidad de área de piel, mayor será el gradiente de concentración entre la superficie de la piel y las capas inferiores de la piel, y a su vez mayor será la fuerza de difusión de la sustancia activa a través de la piel. Por lo tanto, es más probable que una formulación que contenga una mayor concentración de la sustancia activa dé como resultado la penetración de la sustancia activa a través de la piel, y en mayor cantidad, y con una tasa más constante, que una formulación que tenga una menor concentración, en igualdad de condiciones.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen, pero sin limitación, preparaciones líquidas o semilíquidas tales como linimentos, lociones, emulsiones de aceite en agua o agua en aceite tales como cremas, pomadas o pastas, y soluciones o suspensiones. Dichas formulaciones se pueden aplicar a la piel directamente o mediante el uso de hisopos, aplicadores, espátulas y similares, así como en forma de parches transdérmicos. En determinadas realizaciones, el parche minimiza la pérdida de productos farmacéuticos a través de lavado, fricción, rascado y/o frotado de la piel. En otras realizaciones, el parche aumenta la absorción del producto farmacéutico a través de la piel, minimizando al mismo tiempo la exposición de la piel al producto farmacéutico.

Se pueden utilizar potenciadores de la permeabilidad. Estos materiales aumentan la tasa de penetración de fármacos a través de la piel. Los potenciadores típicos en la técnica incluyen etanol, monolaurato de glicerol, PGML (monolaurato de polietilenglicol), dimetilsulfóxido, y similares. Otros potenciadores incluyen el ácido oleico, alcohol oleílico, etoxidiglicol, laurocapram, ácidos alcanocarboxílicos, dimetilsulfóxido, lípidos polares, o N-metil-2-pirrolidona. Un vehículo aceptable para el suministro tópico de algunas de las composiciones de la invención puede contener liposomas. La composición de los liposomas y su uso son conocidos en la técnica (por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.323.219).

Administración parenteral

Como se usa en el presente documento, "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la ruptura física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la rotura del tejido. La administración parenteral incluye, así, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, mediante aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra en el tejido, y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluya, pero no se limita a, inyección subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal y técnicas de infusión dialítica renal.

Formulaciones de liberación controlada y sistemas de suministro de fármacos

5 En otras realizaciones determinadas, las formulaciones de la presente invención pueden ser, pero sin limitación, formulaciones de liberación a corto plazo, de compensación rápida, así como controlada, por ejemplo, liberación sostenida, liberación retardada y liberación pulsátil.

10 La expresión liberación sostenida se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación gradual de un fármaco durante un período prolongado de tiempo y que puede, aunque no necesariamente, dar como resultado niveles sanguíneos sustancialmente constantes de un fármaco durante un período prolongado de tiempo. El período de tiempo puede ser de hasta un mes o más y debe ser una liberación que sea más larga que la misma cantidad de agente administrado en forma de inyección en embolada.

15 Para la liberación sostenida, los compuestos pueden formularse con un polímero adecuado o material hidrófobo que proporcione propiedades de liberación sostenida a los compuestos. Así pues, los compuestos útiles en los métodos de la invención pueden administrarse en forma de micropartículas, por ejemplo, mediante inyección o en forma de obleas o discos mediante implantación.

20 En una realización de la invención, los compuestos de la invención se administran a un paciente, solos o en combinación con otro agente farmacéutico, usando una formulación de liberación sostenida.

25 La expresión liberación retardada se utiliza en el presente documento en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona una liberación inicial del fármaco después de cierto retraso tras la administración del fármaco y que puede, aunque no necesariamente, incluir un retraso de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 12 horas.

30 La expresión liberación pulsátil se usa en el presente documento en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación del fármaco de tal manera que produce perfiles plasmáticos en pulsos del fármaco después de la administración del fármaco.

La expresión liberación inmediata se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación del fármaco inmediatamente después de la administración del fármaco.

35 Como se usa en el presente documento, a corto plazo se refiere a cualquier período de tiempo de hasta e incluyendo aproximadamente 8 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 10 minutos o aproximadamente 1 minuto y todos y cada uno de los incrementos, completos o parciales, de los mismos después de la administración del fármaco.

40 Como se usa en el presente documento, compensación rápida se refiere a cualquier período de tiempo de hasta e incluyendo aproximadamente 8 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 10 minutos o aproximadamente 1 minuto y todos y cada uno de los incrementos completos o parciales de los mismos después de la administración del fármaco.

50 Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar no utilizando más que la experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a los procedimientos, realizaciones, reivindicaciones y ejemplos específicos descritos en el presente documento. Dichos equivalentes se consideraron dentro del alcance de la presente invención y cubiertos por las reivindicaciones adjuntas a la misma. Por ejemplo, debe entenderse que, las modificaciones en las condiciones de reacción, incluyendo, pero sin limitación, los tiempos de reacción, el tamaño/volumen de la reacción y los reactivos experimentales, tales como disolventes, catalizadores, presiones, condiciones atmosféricas, por ejemplo, atmósfera de nitrógeno y agentes reductores/oxidantes, con alternativas reconocidas en la técnica y que no utilizan más que la experimentación de rutina, están dentro del alcance de la presente solicitud.

60 Debe entenderse que, siempre que se proporcionen valores e intervalos en el presente documento, todos los valores e intervalos abarcados por estos valores e intervalos, se prevé que estén todos incluidos dentro del alcance de la presente invención. Además, todos los valores incluidos dentro de estos intervalos, así como los límites superior o inferior de un intervalo de valores, también están contemplados por la presente solicitud.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente aspectos de la presente invención.

Ejemplos experimentales

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes Ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos.

Ejemplo 1: El tratamiento con estrógeno y G-1 ralentiza la proliferación de células de melanoma e impulsa la diferenciación *in vitro* e *in vivo*

La proliferación de células tumorales se ralentizó tanto en células de melanoma de ratón como humano después del tratamiento con estrógeno o G-1, un agonista específico de GPER. Se trataron líneas celulares de melanoma humano y de ratón *in vitro* con estrógeno (E2 25 nM) (FIG. 4A-4F), el agonista de GPER G-1 (G1 100 nM) o un vehículo de suministro. Se midieron la proliferación y diferenciación celular (producción de melanina). Los resultados mostraron que tanto el tratamiento con estrógeno como con G-1 ralentizó la proliferación de células de melanoma e impulsó la diferenciación *in vitro* (FIG. 4A-4F).

Las células de melanoma humano y de ratón tratadas con estrógeno o el agonista específico de GPER G-1, crecieron más lentamente en ratones y formaron tumores significativamente más pequeños (FIG. 5-6). Se pretrataron líneas celulares de ratón (B16) y humana (WM46) con estrógeno, G-1 o vehículo *in vitro* durante una semana y luego se inyectaron en cantidades iguales en el flanco izquierdo (tratado con vehículo) o derecho (tratado con E2) de los ratones, induciendo la formación de tumores (N = 5 ratones por grupo) (FIG. 5). 14-16 días después, se tomaron imágenes de los ratones y se recolectaron y pesaron los tumores. El pretratamiento con estrógenos inhibió el crecimiento tumoral *in vivo* aproximadamente 3 veces (FIG. 5). De modo similar, el tratamiento con G-1 inhibió el crecimiento tumoral *in vivo* (FIG. 6).

La exposición transitoria al estrógeno fue suficiente para inducir una memoria epigenética que mantiene el estado más diferenciado. Los melanocitos humanos normales recibieron un tratamiento por pulsos de estrógeno, que consistió en 4 días de tratamiento con estrógeno seguido de un descanso de 8 días. La RNAseq demostró que los melanocitos tratados transitoriamente con estrógeno mantuvieron la expresión al alza de todos los principales marcadores de diferenciación de melanocitos, incluida la tirosinasa (TYR), la proteína relacionada con tirosinasa (TRP1), el receptor de melanocortina 1 (MC1R), melan-A (MLANA) y dopacromo tautomerasa (DCT), y la disminución de la expresión de marcadores de melanoma agresivo tales como la proteína de premelanosomas (PMEL) (FIG. 3). Los cambios en las cantidades de marcadores de diferenciación de melanocitos fueron aún más evidentes a nivel de proteínas. Las células tratadas con estrógeno también producen más pigmento, lo que indica que están más diferenciadas en comparación con las células de control (tratadas con vehículo) (FIG. 3).

Ejemplo 2: Los embarazos múltiples limitan la melanomagénesis e impulsan la diferenciación

Las líneas celulares y los tumores subcutáneos se utilizan habitualmente para estudios del cáncer porque son rápidos y sencillos, pero es posible que no sean modelos fisiológicamente fieles de enfermedades humanas reales. En el presente documento se describe un modelo de xenoinjerto humano genomodificado que proporciona un mejor modelo de melanoma humano.

Se genomodificaron xenoinjertos de melanoma humano con lentivirus para expresar oncoproteínas mutantes que se sabe están asociadas con el melanoma en melanocitos humanos normales. Los melanocitos primarios se transdujeron con diBRaf^{V600E}, CDK4^{R24C}, dnp53^{R248W} y hTERT (FIG. 7A). A continuación, se estableció piel organotípica *in vitro* y luego se injertó en el lomo de ratones hembra (FIG. 7B). Los ratones se dividieron en dos grupos, no reproductores y reproductores (N = 3 ratones por grupo), y el melanoma se formó durante las siguientes 15 semanas. Se recogió el tejido y se sometió a ensayo en cuanto a genes mutados. En los grupos de no reproductores, se observaron grandes nidos proliferativos de melanocitos con propagación hacia arriba, característico del melanoma en fase de crecimiento radial (FIG. 7C)). Se transfirieron cantidades limitadas de melanina a la epidermis, lo que indica que los melanocitos ya no realizaban su función diferenciada. En el grupo reproductor, no se observaron grandes nidos proliferativos y se observó un aumento en la cantidad de melanina que se transfiere a la epidermis, lo que indica que los melanocitos estaban realizando su función diferenciada mejor que los controles reproductivos. En conjunto, esto muestra que los embarazos múltiples (3 para este experimento) sirven para limitar la melanomagénesis e impulsar la diferenciación.

Como se muestra en las FIG. 8A-8E, después de que los injertos sanaron, los ratones se distribuyeron al azar y se separaron en grupos reproductores o no reproductores, y luego se les proporcionó alimento con doxiciclina para inducir el oncogén BRAF^{V600E} en todos los animales. Después de 15 semanas y 3 embarazos consecutivos en el grupo reproductor (o ningún embarazo en el grupo no reproductor), se recolectaron tejidos humanos y se analizaron histológicamente (FIG. 8A). Los injertos del grupo no reproductor se convirtieron en neoplasias melanocíticas con características distintivas del melanoma humano, que incluyen tamaños grandes, nidos melanocíticos mitóticamente activos con atipia celular. En cambio, los tejidos del grupo reproductor eran relativamente poco destacables y contenían principalmente melanocitos en reposo, individuales y no proliferativos que estaban confinados en la capa epidérmica basal. Estos resultados muestran que los embarazos repetidos inhiben el crecimiento de la neoplasia melanocítica humana impulsada por BRAf (FIG. 8B-8D).

La función principal de un melanocito epidérmico completamente diferenciado es producir pigmento melanina que

protege la piel de la radiación ultravioleta. Como ocurre con la mayoría de los tipos celulares, la diferenciación y proliferación de melanocitos están inversamente correlacionadas y los melanocitos en la piel normal rara vez proliferan fuera de los folículos pilosos en ciclo. El tejido del melanoma generalmente está menos diferenciado que los melanocitos normales o los nevos benignos. En los presentes estudios de xenoinjerto, el embarazo se asoció con un aumento en la diferenciación de los melanocitos en comparación con el grupo no reproductor, como lo evidencia la relativa falta de melanocitos en proliferación y el correspondiente aumento de melanina epidérmica. Aunque el grupo no reproductor, que desarrolló melanomas, tenía significativamente más melanocitos en la piel injertada que el grupo reproductor, la abundancia de melanina dentro de los queratinocitos epidérmicos circundantes se redujo notablemente (FIG. 8E). Por tanto, el embarazo inhibe el desarrollo del melanoma al inducir la diferenciación de los melanocitos.

Ejemplo 3: La señalización de GPER impulsa la diferenciación estable en melanocitos humanos normales y en el melanoma

Para probar si las hormonas gestacionales inducen cambios duraderos en la diferenciación de los melanocitos que puedan afectar su susceptibilidad futura a la transformación, los melanocitos humanos primarios se expusieron transitoriamente a estrógeno o progesterona (FIG. 11A-11E). El estrógeno impulsó la diferenciación, que se asoció con una producción aumentada de melanina, mientras que la progesterona tuvo efectos opuestos (FIG. 11A).

Después de la retirada de las hormonas, las células tratadas con progesterona volvieron rápidamente a su nivel inicial de producción de melanina. En cambio, las células tratadas con estrógeno permanecieron más diferenciadas después de la retirada de estrógeno y produjeron de manera estable más melanina a través de divisiones celulares continuas durante los 50 días posteriores. Posteriormente, una subpoblación de células diferenciadas por exposición transitoria a estrógeno se trató con progesterona. Esto invirtió los efectos del estrógeno y la producción de melanina disminuyó al nivel inferior al inicial observado durante el tratamiento inicial con progesterona. Después de retirar la progesterona, estas células regresaron completamente al estado de diferenciación intensificado inducido por la exposición inicial al estrógeno. De manera concordante con una diferenciación celular aumentada, la exposición a estrógeno se asoció con aumentos estables en los antígenos de diferenciación de melanocitos clásicos, incluyendo tirosinasa y MC1R (FIG. 11B). Estos resultados indican que el estrógeno transitorio induce un programa de diferenciación duradero y prolongado en los melanocitos.

Para probar si la señalización transitoria del GPER induce un estado de diferenciación persistente en células de melanoma que afecte el crecimiento tumoral posterior *in vivo*, las células de melanoma se trataron con estrógeno, G-1 o vehículo *in vitro*, y posteriormente se inyectó un número igual de células tratadas en ratones hospedadores (FIG. 11C). El pretratamiento con estrógeno o G-1 redujo de manera destacada el tamaño tumoral posterior (FIG. 11D-11E), lo que indica que la activación transitoria de GPER tiene efectos duraderos sobre el crecimiento tumoral.

Ejemplo 4: La señalización de GPER da como resultado la pérdida de C-Myc en el melanoma

La amplificación de *c-Myc* (un factor de transcripción que antagoniza la diferenciación y propicia la proliferación, la supervivencia y el escape de la vigilancia inmunitaria) es una de las alteraciones genéticas más comunes en los cánceres humanos, incluido el melanoma. La señalización del GPER empobreció la proteína *c-Myc* (FIG. 12, paneles A-C).

Adicionalmente, la señalización de GPER indujo una relativa detención del crecimiento, asociado con la hipofosforilación de Rb en células de melanoma tanto de ratón como humano (FIG. 12, panel D). Las células de melanoma genomodificadas para mantener la proteína *c-Myc* frente a la activación de GPER eran resistentes a G-1, lo que indica que la pérdida de *c-Myc* es un mediador importante de los efectos antiproliferativos del GPER (FIG. 12, panel E).

La pérdida de *c-Myc* después de la activación de GPER fue rápida y dependiente de PKA, lo que sugiere que la señalización del receptor acoplado a proteína G estimulante canónica desestabilizó la proteína *c-Myc* (FIG. 12, paneles F-G). De manera concordante con esto, la semivida de *c-Myc* se redujo de manera destacable después de la activación del GPER, de una manera dependiente del proteosoma (FIG. 12, paneles H-I).

Ejemplo 5: El tratamiento con G-1 *in vivo* altera las proteínas inmunomoduladoras

Más allá de su papel en la proliferación y la diferenciación, *c-Myc* regula positivamente la expresión de múltiples reguladores del punto de control inmunitario inhibidores, incluido PDL1. La activación farmacológica transitoria de GPER en células de melanoma dio como resultado disminuciones paralelas tanto en *c-Myc* como en PD-L1 (FIG. 13A-13C). En células genomodificadas para mantener *c-Myc* en presencia del agonista de GPER, se conservó PD-L1 (FIG. 13G).

Ejemplo 6: La activación transitoria de GPER inhibe la proliferación y aumenta la respuesta a la inmunoterapia

Como se demuestra en el presente documento, La señalización GPER indujo cambios estables en las células tumorales que antagonizaron la proliferación tumoral y disminuyeron la expresión de proteínas inmunosupresoras en las células tumorales. Por tanto, se estudió si la activación del GPER potencia la actividad antitumoral de los inhibidores de bloqueo del punto de control inmunitario.

Para determinar si la señalización del GPER intrínseca de las células tumorales influye en la vulnerabilidad del melanoma a la terapia del punto de control inmunitario, se realizaron estudios, basados en la observación de que la diferenciación impulsada por GPER es duradera. Se utilizó G-1 para activar a GPER e impulsar la diferenciación en células de melanoma murino B16F10 *in vitro* (FIGURA 13D). A continuación, se inyectaron números equivalentes de vehículo o de células tumorales tratadas con G-1 en ratones C57BL/6 singénicos y los animales se trataron con anticuerpo α PD-1 o control de isotipo de anticuerpo.

El pretratamiento con G-1 por sí solo inhibió el crecimiento tumoral posterior y prolongó la supervivencia en comparación con los controles. La monoterapia con anticuerpo α PD-1 también prolongó de manera similar la supervivencia. Sin embargo, la combinación del pretratamiento con G-1 con el anticuerpo α PD-1 extendió notablemente la supervivencia más allá de la observada con cualquiera de los agentes solos, lo que indica que la actividad de GPER en células tumorales indujo cambios persistentes en el tumor suficientes para mejorar la actividad antitumoral de la terapia con α PD-1 administrada sistémicamente (FIG. 13E-13F).

Ejemplo 7: El tratamiento de ratones portadores de melanoma con inmunoterapia de G-1 y α PD-1 extiende notablemente la supervivencia

Para determinar si G-1 tiene utilidad terapéutica como agente suministrado sistémicamente con o sin inhibidores del punto de control inmunitario, se trataron ratones singénicos portadores de melanoma B16F10 con G-1 subcutáneo, anticuerpo α PD-1, o ambos, y supervivencia se comparó con los ratones correspondientes tratados con vehículos y controles de isotipo de anticuerpo (en particular, anticuerpo de control de isotipo no específico 2A3) (FIG. 14A). El volumen tumoral total se evaluó después de 5 a 50 días.

G-1 fue bien tolerado en ratones y la monoterapia prolongó la supervivencia en la misma medida que α PD-1. Cada monoterapia y tratamiento combinado con α PD-1 y G-1 ralentizó el crecimiento tumoral (FIG. 14B). Sorprendentemente, el tratamiento combinado con α PD-1 y G-1 prolongó la supervivencia 7 veces más que con cualquiera de los agentes solos, indicando un marcado beneficio sinérgico (FIG. 14C).

Aunque el melanoma B16F10 es el modelo más utilizado para los estudios de inmunología del melanoma y los resultados experimentales se han trasladado en gran medida a los seres humanos, B16F10 carece de las mutaciones oncoimpulsoras de BRAF o NRAS presentes en la mayoría de los melanomas humanos. Para probar si la señalización de GPER tiene una actividad antimelanoma similar en un modelo potencialmente más importante desde el punto de vista médico, se utilizaron células de melanoma genéticamente definidas de la colección de melanomas de ratón de la Universidad de Yale (YUMM, del inglés *Yale University Mouse Melanoma*). Este recurso contiene líneas de melanoma generadas a partir de modelos de ratón establecidos genéticamente modificados que se retrocruzaron con acervos de C57BF/6 específicamente para facilitar los estudios de inmunología. Se inyectaron células YUMM 1.7 (BRAFV600E/wt Pten^{-/-}Cdkn2^{-/-}) en ratones C57BF/6 y se inició el tratamiento con G-1 con y sin α PD-1 después de que los tumores alcanzaron de 3 a 4 mm de diámetro (día 14) (Figura 14D).

De manera similar a los resultados observados con el melanoma B16F10, la monoterapia con G-1 o α PD-1 dio como resultado aumentos modestos, pero significativos, de la supervivencia, mientras que el tratamiento combinado prolongó notablemente aún más la supervivencia, incluidos los supervivientes a largo plazo (FIG. 14E-14F).

Ejemplo 8: El tratamiento con G-1 *in vivo* altera las células inmunitarias infiltrantes de tumor

Los presentes resultados indican que la actividad antitumoral de GPER es independiente de los oncoimpulsos tumorales. De manera concordante con la hipótesis de que la activación de GPER cambia la naturaleza de la infiltración inmunitaria, el tratamiento con G-1 en ratones portadores de melanoma aumentó varias subpoblaciones de células inmunitarias, incluyendo los linfocitos T y las células NK, lo que sugiere una respuesta inflamatoria más robusta (FIG. 15A-15C).

Ejemplo de Referencia 9: El tratamiento con G-1 impulsa la acetilación de histonas y presenta sinergia con los inhibidores de la HDAC en el melanoma

Para comenzar a identificar los cambios epigenéticos que probablemente subyacen a la diferenciación estable de melanocitos después de la activación del GPER, se utilizó espectrometría de masas para obtener un análisis global de las modificaciones postraduccionales de histonas en CR tratadas con estrógeno. De manera concordante con un mecanismo que implica a la actividad de CREB, se observaron aumentos significativos (en 3 repeticiones biológicas independientes) en muchas marcas de acetilación de histonas reguladas por los compañeros de unión de CREB CBP/P300, incluidas H3K122, H3K23 y H3K18 (FIG. 16A).

En cambio, la marca H3K9ac, que no está escrita por CBP/P300, disminuyó después del tratamiento con estrógeno. Dado que las modificaciones postraduccionales de histonas, incluida la acetilación, median en la memoria transcripcional hereditaria en otros contextos, en determinadas realizaciones no limitantes, las modificaciones de histonas reguladas por CBP/P300 son responsables de mantener el estado intensificado de melanocitos diferenciados a lo largo de las divisiones celulares. Hay niveles más altos de marcas de acetilo de histonas escritas por CBP en nevos humanos benignos y células de melanoma no oncógenas, en comparación con tejidos de melanoma y líneas celulares de melanoma oncógenas. En conjunto, esto indica que las acetilaciones de histonas pueden mantener el estado diferenciado, antiproliferativo y no oncógeno de las células de melanoma estimuladas por GPER.

Las marcas de acetilo de las histonas se eliminan mediante varias histonas desacetilasas (las HDAC), que están reguladas de manera anómala en muchos cánceres. Aunque los inhibidores de la HDAC están aprobados como agentes antineoplásicos para el linfoma cutáneo, el mieloma y el cáncer de páncreas, su utilidad en el melanoma no está clara. En ensayos en seres humanos, los inhibidores de HDAC (HDACi) presentaron generalmente solo una actividad antimelanoma modesta como agentes de monoterapia. La eficacia de la HDAC puede haber estado limitada por el hecho de que los ensayos se realizaron sin un impulsor de la diferenciación para propiciar la formación de marcas de acetilación en histonas u otras oncoproteínas cruciales (tales como c-Myc), que luego serían estabilizadas por los HDACi. Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, los efectos antineoplásicos de los inhibidores de HDAC pueden potenciarse mediante regímenes farmacológicos combinados que también propician la acetilación de histonas en sitios funcionalmente cruciales. Los agonistas de los HDACi y de GPER propician de forma independiente la diferenciación de las células de melanoma y también cooperan para potenciar la actividad del otro (FIG. 16B-16C).

Ejemplo de Referencia 10: La señalización de GPER reduce la proliferación de células de ADP *in vitro* e *in vivo*

El cáncer de páncreas es menos común en mujeres que en hombres y también menos común en usuarios de terapias hormonales basadas únicamente en estrógeno, lo que sugiere que el GPER también puede tener un papel supresor de tumores en el cáncer de páncreas. Utilizando un conjunto recientemente disponible de líneas celulares de adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) singénicas, se examinaron los efectos de la activación del GPER sobre los niveles de la proteína c-Myc. Después de la exposición al G-1, c-Myc y pRB se redujeron en estas líneas celulares, de forma concordante con los cambios observados en líneas celulares de melanoma (FIG. 17A).

Además de que los niveles de estas moléculas de señalización cambian, las tasas de proliferación de estas líneas celulares también se inhibieron por la activación de GPER a través de G-1 (FIG. 17B).

Para demostrar que la administración sistémica de G-1 alteraba el crecimiento tumoral *in vivo*, se crecieron tumores de ADP en ratones durante 18 días, luego se les administró la dosis convencional de G-1 durante 3 días consecutivos (FIG. 17C).

Incluso con un corto tiempo de seguimiento de 4 días después del tratamiento, los tumores eran significativamente más pequeños en 2 líneas celulares de ADP independientes, lo que sugiere que la activación del GPER puede tener potentes efectos antitumorales en el ADP (FIG. 17D).

Ejemplo de Referencia 11: La señalización de GPER reduce la proliferación de células de CPNM *in vitro* e *in vivo* y tiene efectos combinatorios con la inmunoterapia α PD-1

Los antecedentes reproductivos también influyen en el cáncer de pulmón. Las mujeres tienen un riesgo cada vez menor de padecer cáncer de pulmón correlacionado con el número de hijos que han tenido. Para demostrar que la señalización de G-1/GPER tiene actividad en la línea LLC1 del CPNM, esta línea se trató con G-1 y se observaron niveles elevados de pCREB después de 30 minutos (FIG. 18A).

El tratamiento a largo plazo de LLC1 con G-1 dio como resultado una proliferación disminuida (FIG. 18B) y una reducción de la proteína c-Myc (FIG. 18C).

El empobrecimiento de c-Myc se produjo rápidamente (FIG. 18D) y los mismos efectos de señalización también se producen en una línea adicional de CPNM, TC-1 (FIG. 18E).

Para probar si G-1 tenía actividad *in vivo* y presenta sinergia con la inmunoterapia de PD-1, se crecieron en ratones tumores de LLC1 que se trataron con G-1 subcutáneo, anticuerpo α PD-1, o ambos, y la supervivencia se comparó con los ratones correspondientes tratados con vehículos y con controles de anticuerpo de isotipo. La monoterapia con G-1 o α PD-1 inicialmente ralentizó el crecimiento tumoral (FIG. 18F), pero finalmente no alteró significativamente la supervivencia (FIG. 18G). La terapia combinada con G-1 y α PD-1 ralentizó aún más el crecimiento tumoral (FIG. 18F) y también prolongó significativamente la supervivencia (FIG. 18G).

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista del receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER) que aumenta la diferenciación celular en un cáncer que expresa el receptor acoplado a proteína G (GPCR) para su uso en un método para tratar o prevenir un cáncer que expresa GPCR en un sujeto,
 5 en donde el agonista de GPER es G-1 (rel-1-[4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-il)-3aR,4S,5,9bS-tetrahidro-3H-ciclopenta[c]quinolina-8-il]-etanona), o un enantiómero o diastereoisómero del mismo;
 en donde al sujeto se le coadministra al menos un inhibidor del punto de control PD-1, en donde al menos un inhibidor del punto de control PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1; y
 10 en donde el cáncer que expresa GPCR es melanoma.
2. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista del receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER) y al menos un inhibidor del punto de control PD-1 para su uso en un método para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto,
 15 en donde el cáncer es melanoma;
 en donde el agonista de GPER es G-1 (rel-1-[4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-il)-3aR,4S,5,9bS-tetrahidro-3H-ciclopenta[c]quinolina-8-il]-etanona), o un enantiómero o diastereoisómero del mismo;
 en donde el agonista de GPER aumenta la diferenciación celular en el cáncer; y
 en donde al menos un inhibidor del punto de control PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1.
 20
3. La cantidad terapéuticamente eficaz del agonista de GPER para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el agonista de GPER se administra al sujeto como una composición farmacéutica que comprende además al menos un portador farmacéuticamente aceptable, o
 en donde el agonista de GPER se administra al sujeto mediante al menos una vía de administración
 25 seleccionada del grupo que consiste en inhalatoria, oral, rectal, vaginal, parenteral, tópica, transdérmica, pulmonar, intranasal, bucal, oftálmica, intratecal, intracraneal e intravenosa.
4. La cantidad terapéuticamente eficaz del agonista de GPER para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3,
 30 en donde el sujeto no tiene el cáncer o no se le ha diagnosticado que padece el cáncer, y
 en donde el agonista de GPER se administra al sujeto durante un período de 3 semanas o menos, preferentemente 2 semanas o menos, más preferentemente 1 semana o menos.
5. La cantidad terapéuticamente eficaz del agonista de GPER para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el sujeto es un mamífero, preferentemente el mamífero es humano.
 35
6. Una composición que comprende (i) un agonista de GPER y (ii) un inhibidor del punto de control PD-1, en donde el agonista de GPER es G-1 (rel-1-[4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-il)-3aR,4S,5,9bS-tetrahidro-3H-ciclopenta[c]quinolina-8-il]-etanona), o un enantiómero o diastereoisómero del mismo, y en donde al menos un
 40 inhibidor del punto de control PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1.
7. Un kit que comprende (i) un agonista de GPER y (ii) un inhibidor del punto de control PD-1, y material instructivo para su uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto, en donde el agonista de GPER es G-1 (rel-1-[4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-il)-3aR,4S,5,9bS-tetrahidro-3H-ciclopenta[c]quinolina-8-il]-etanona), o un
 45 enantiómero o diastereoisómero del mismo, en donde al menos un inhibidor del punto de control PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1, y en donde el cáncer es melanoma.

FIG. 1

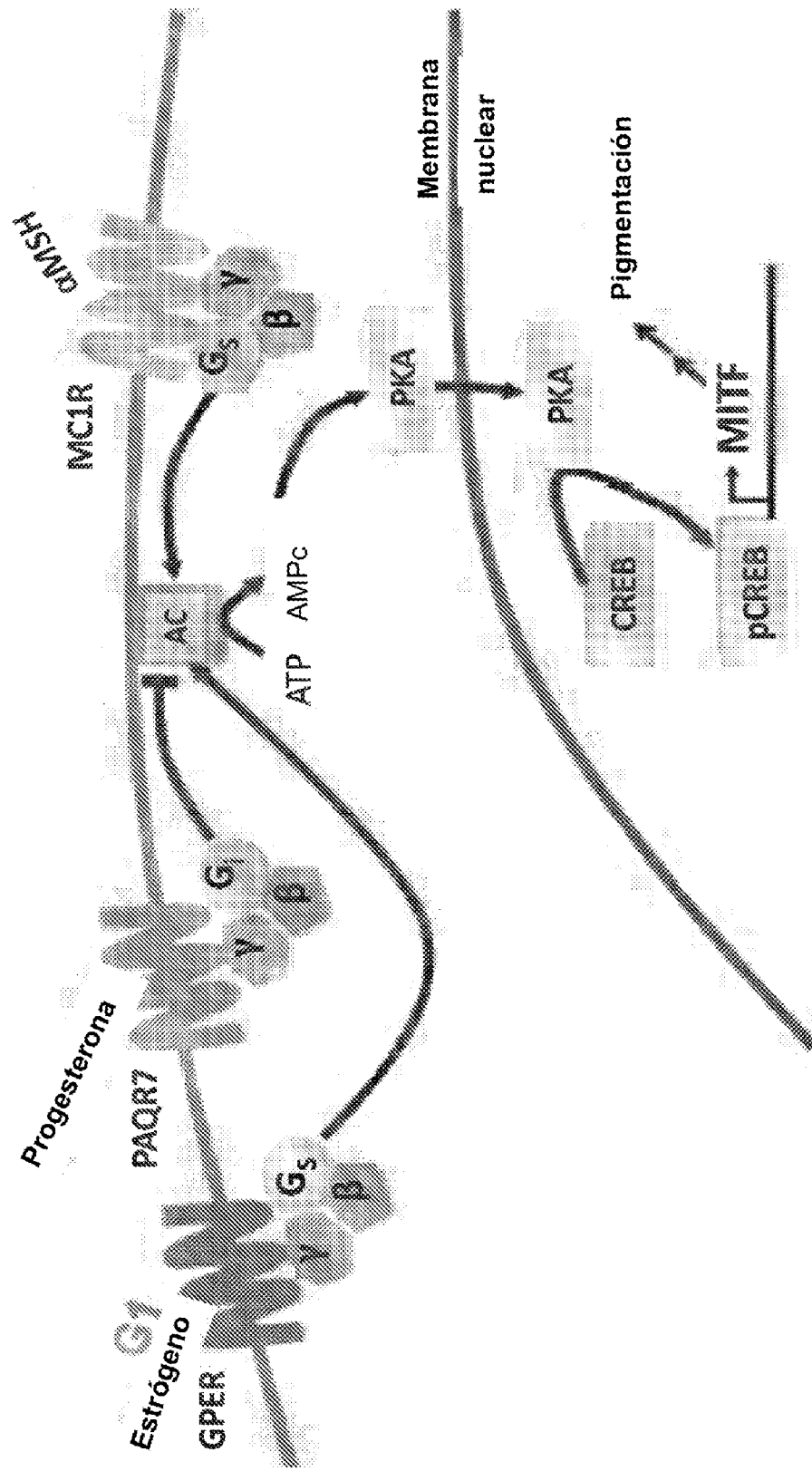


FIG. 2

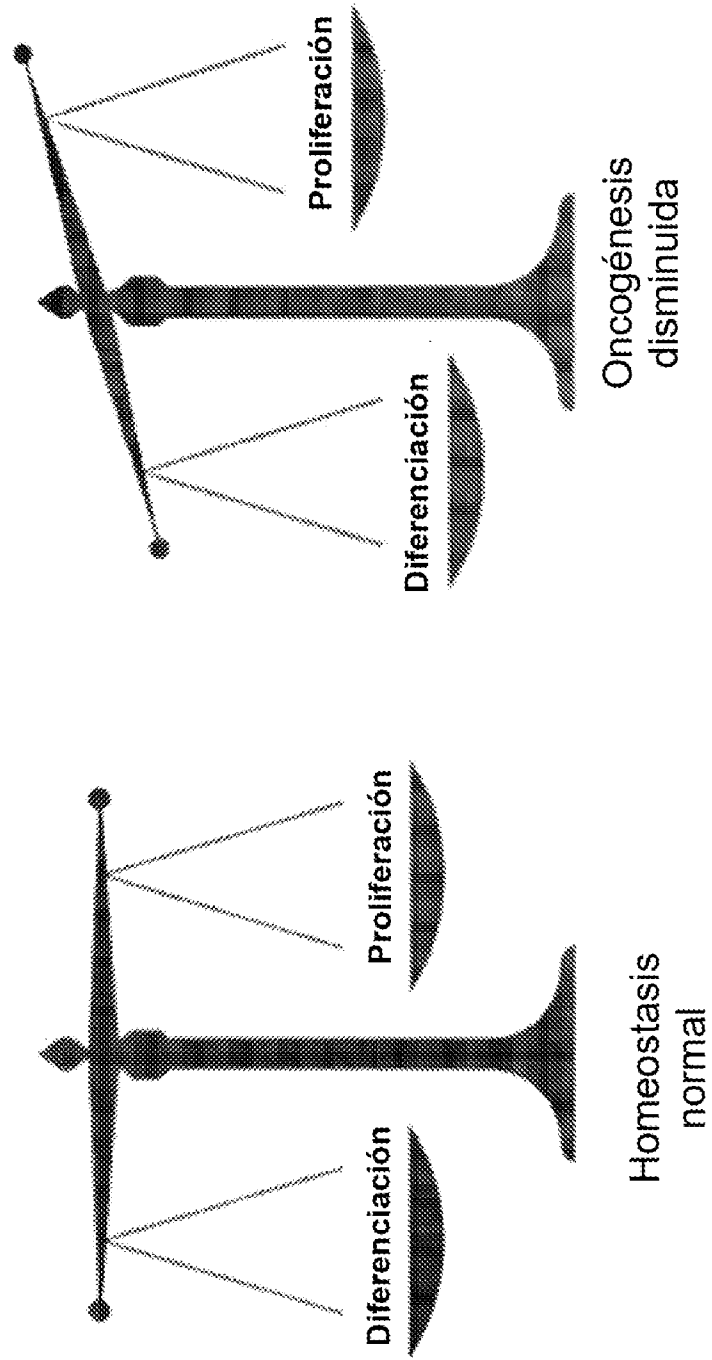
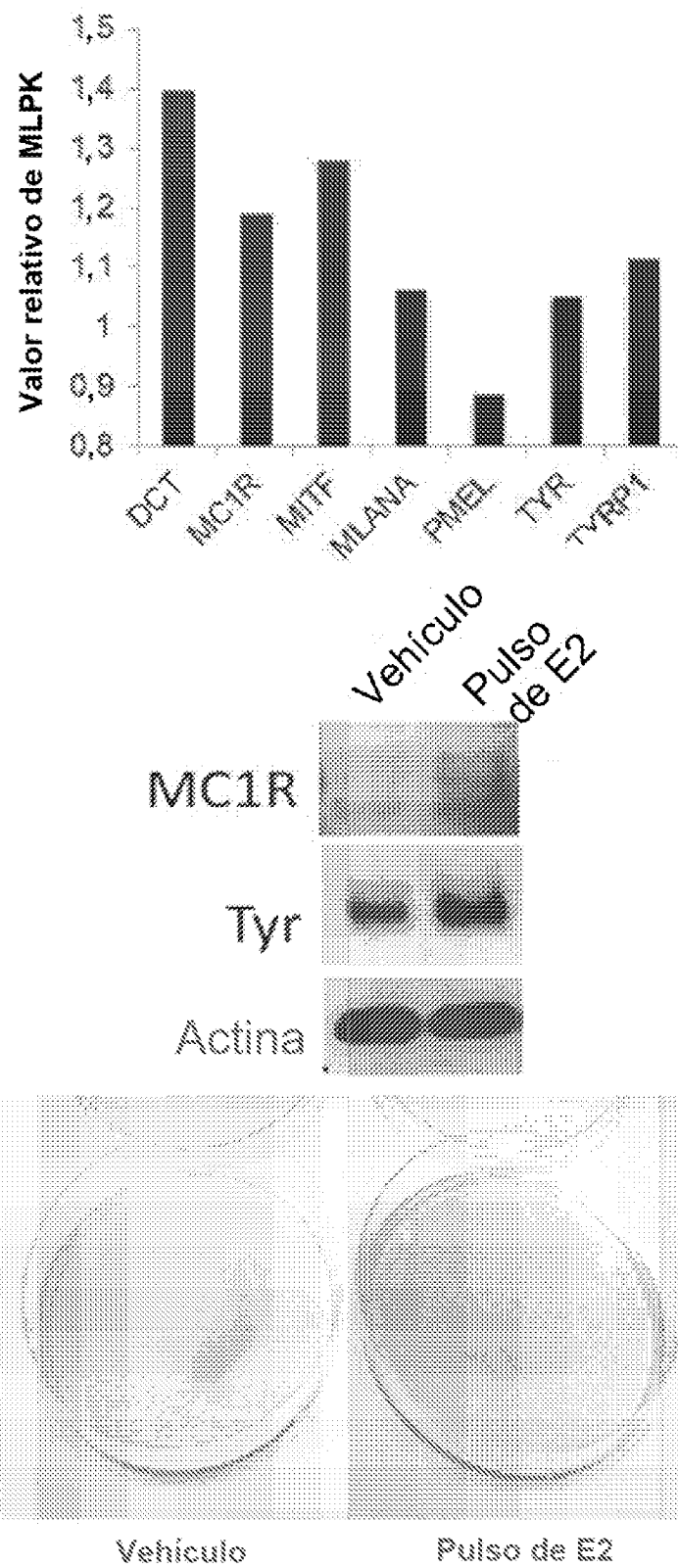


FIG. 3



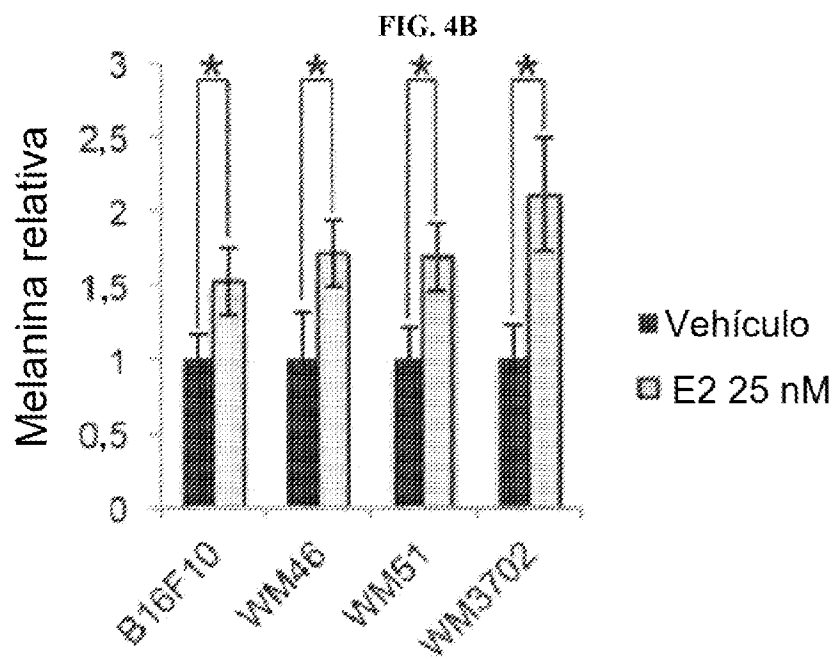
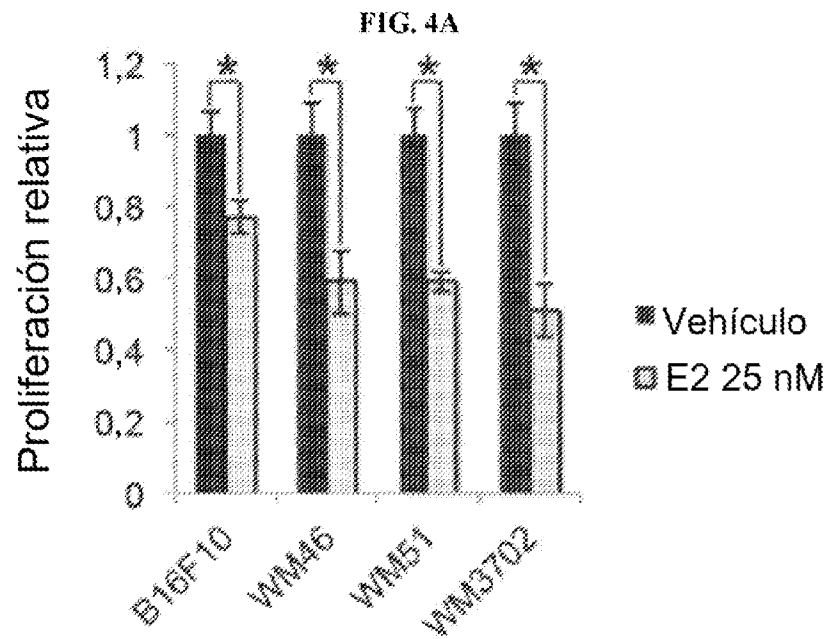


FIG. 4C

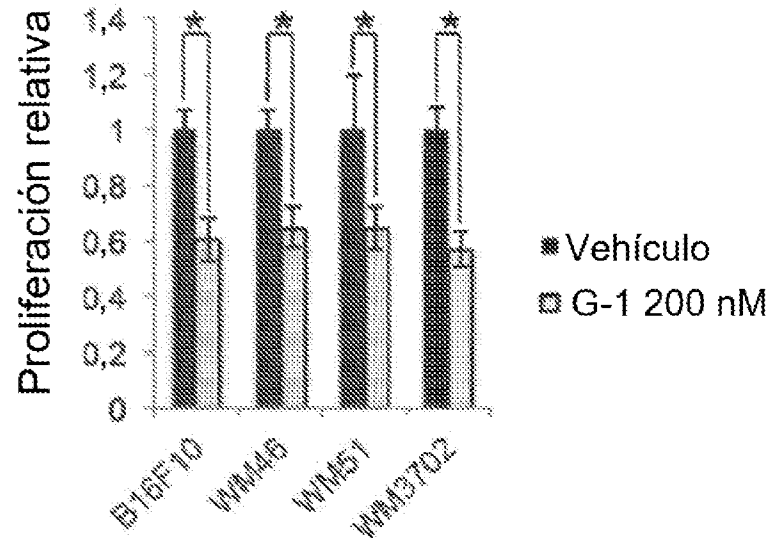


FIG. 4D

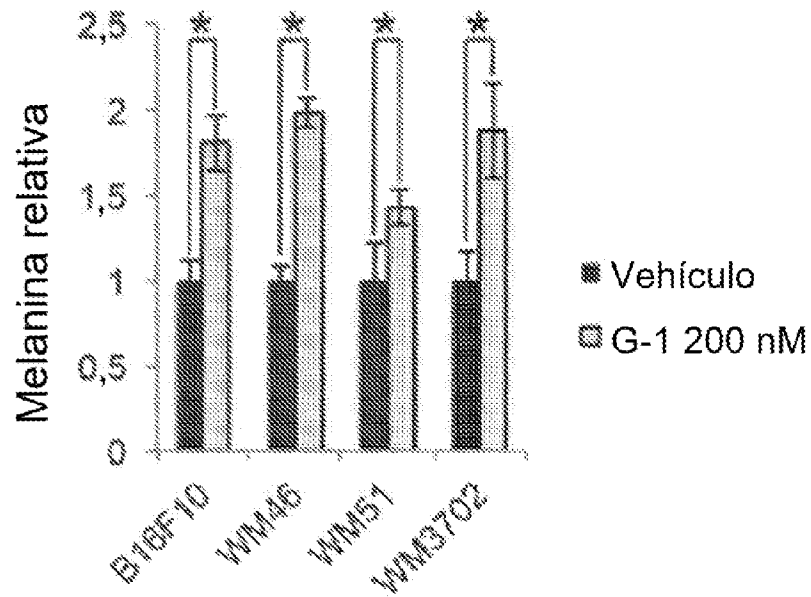


FIG. 4E

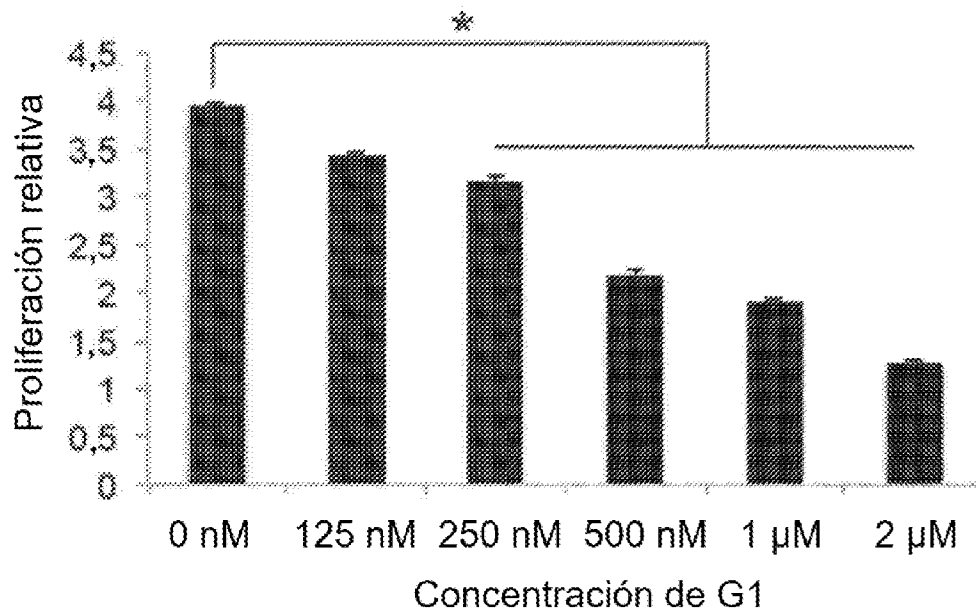


FIG. 4F

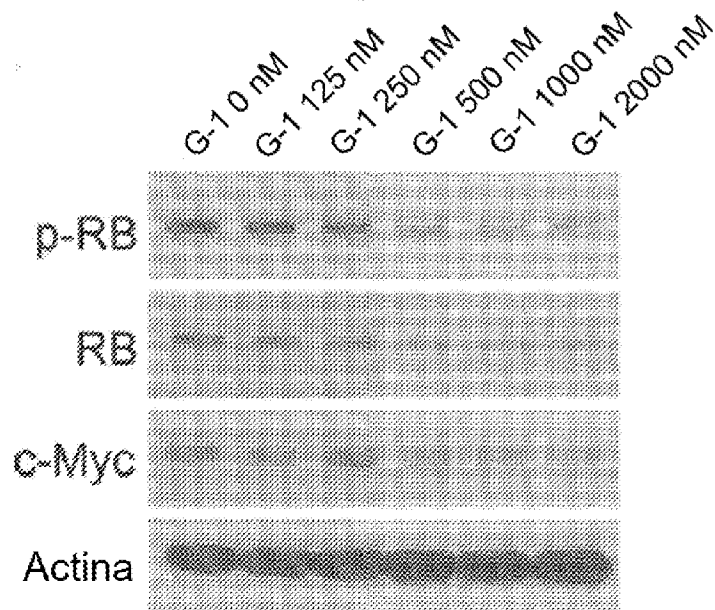


FIG. 5

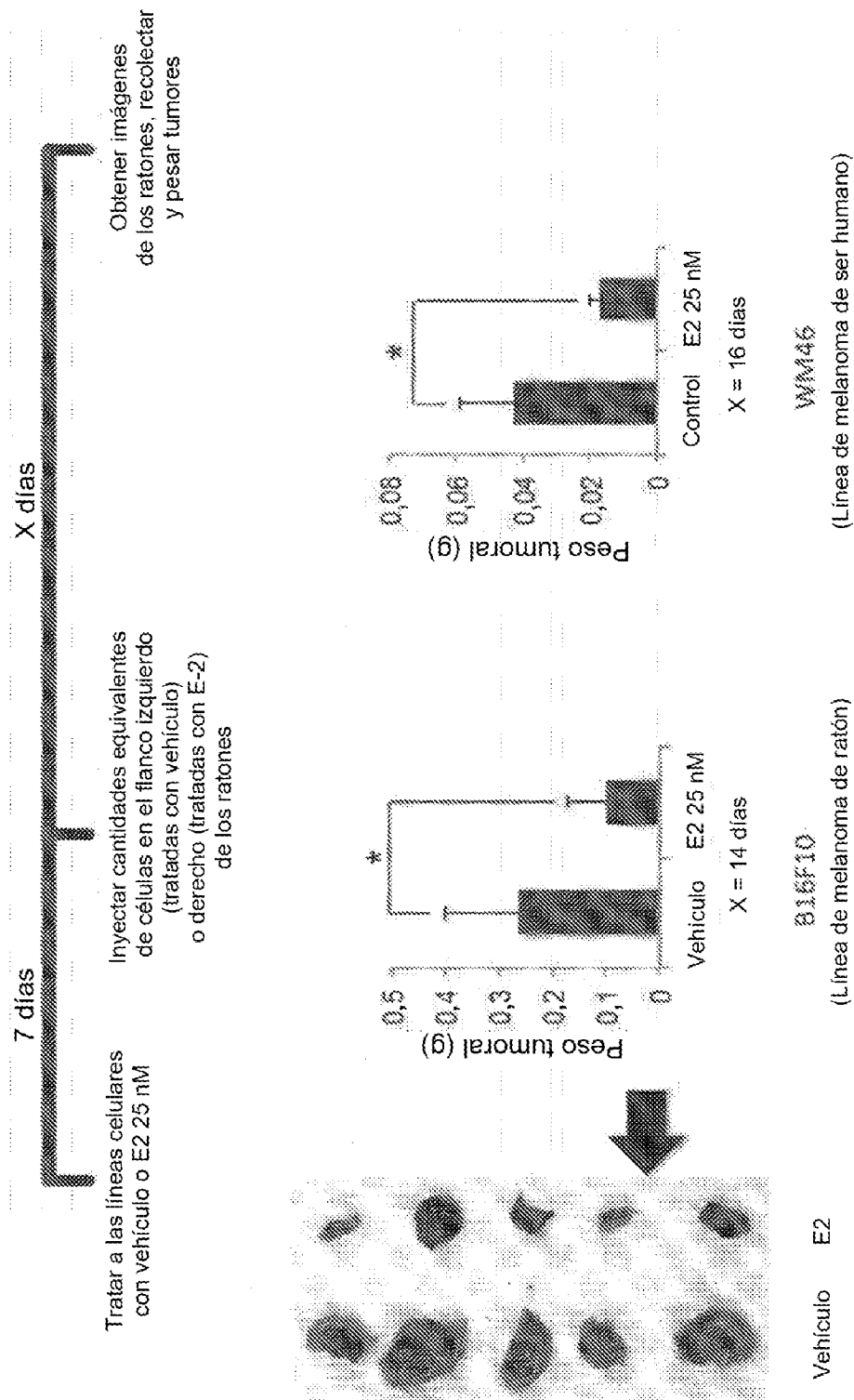


FIG. 6

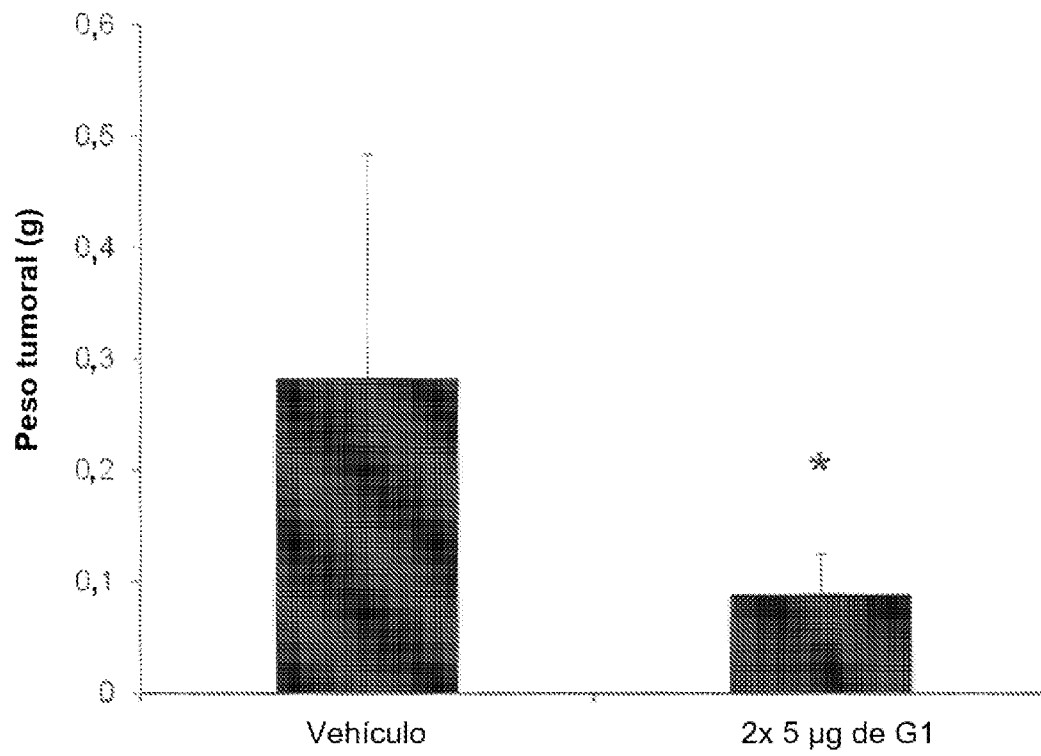


FIG. 7A

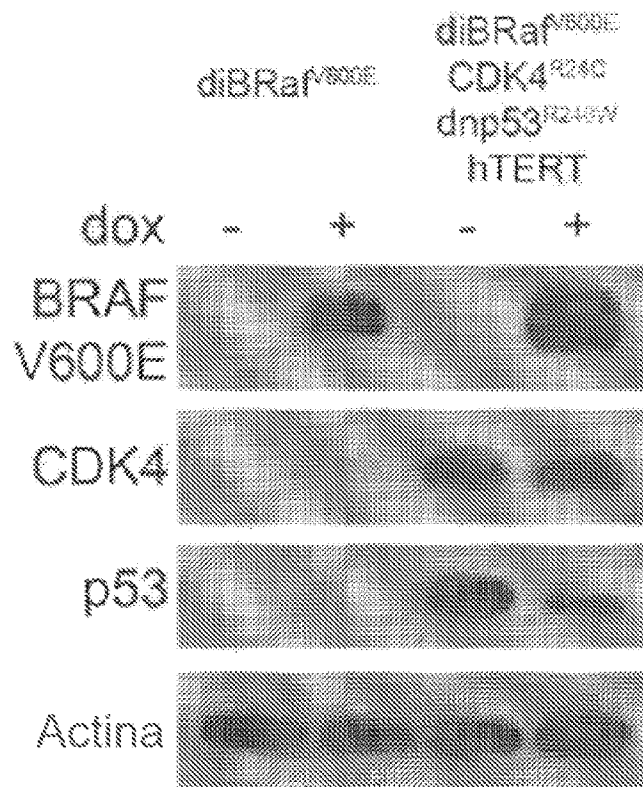


FIG. 7B



FIG. 7C

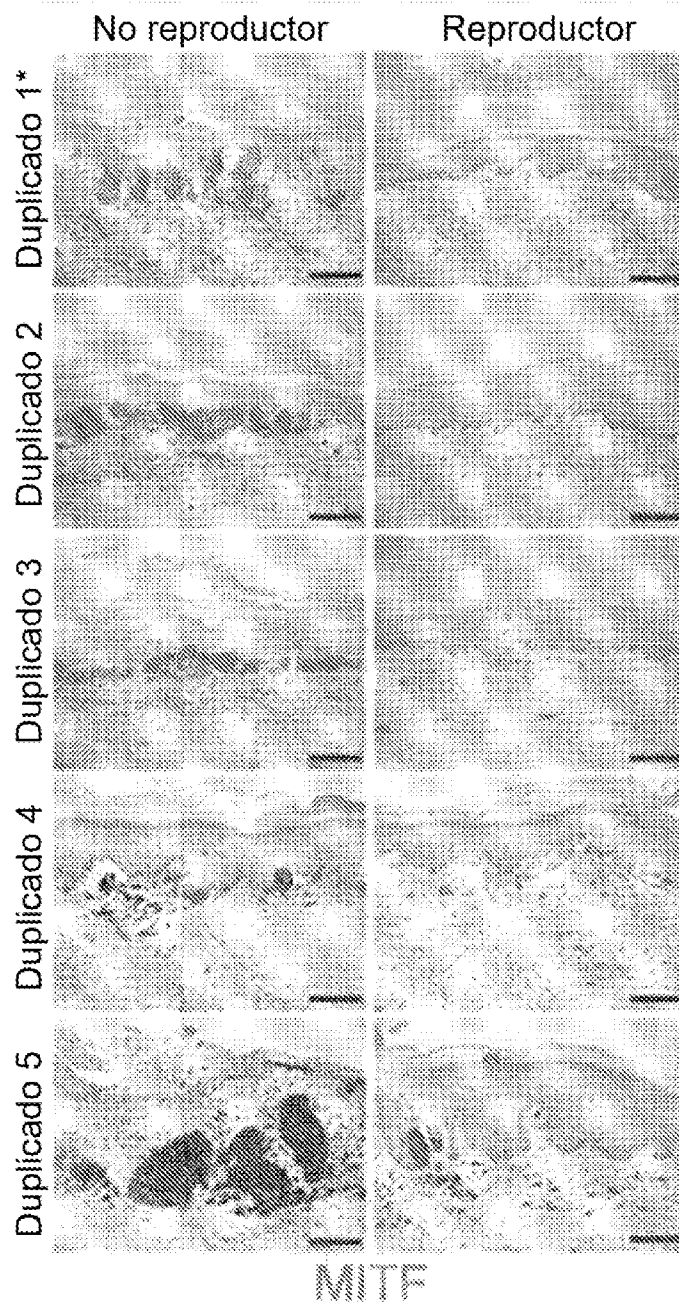


FIG. 8A

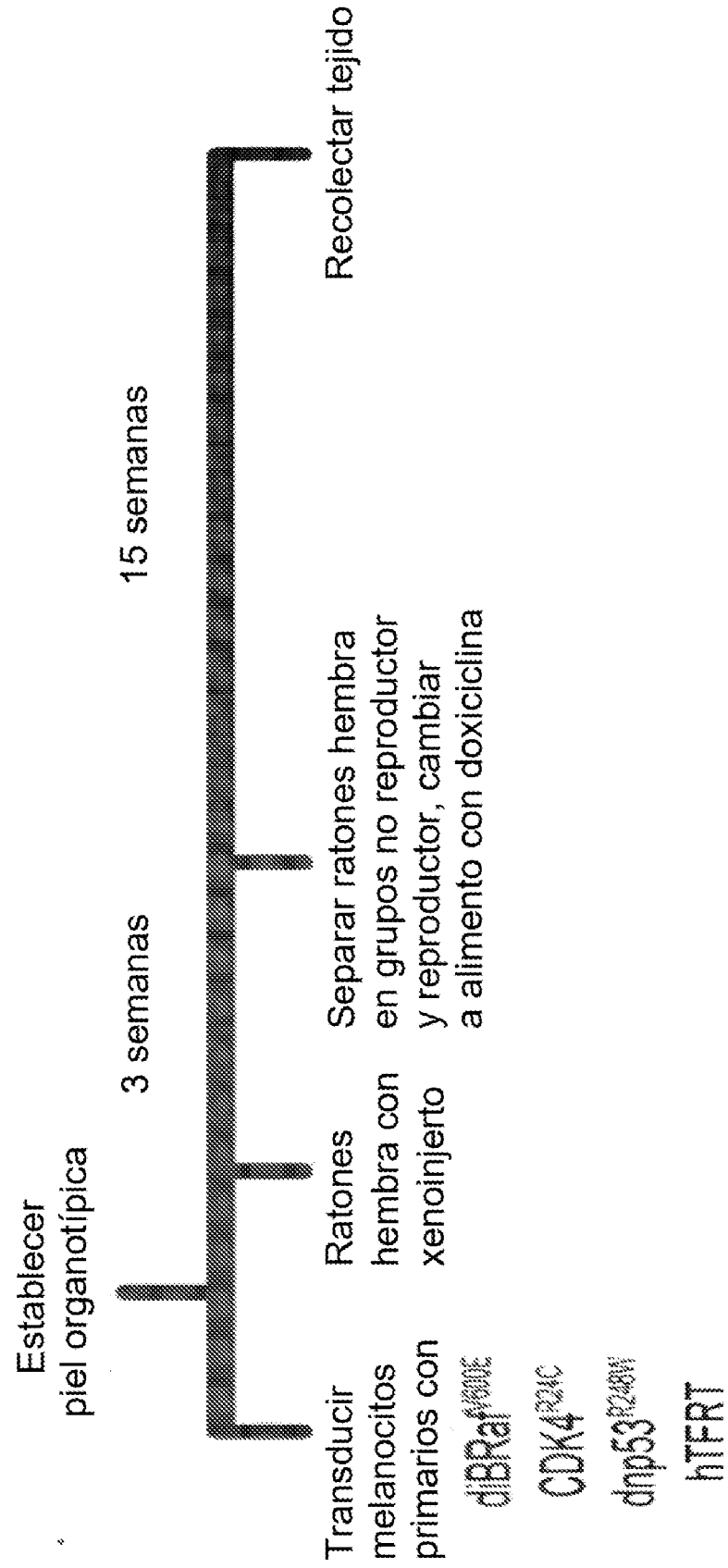


FIG. 8B

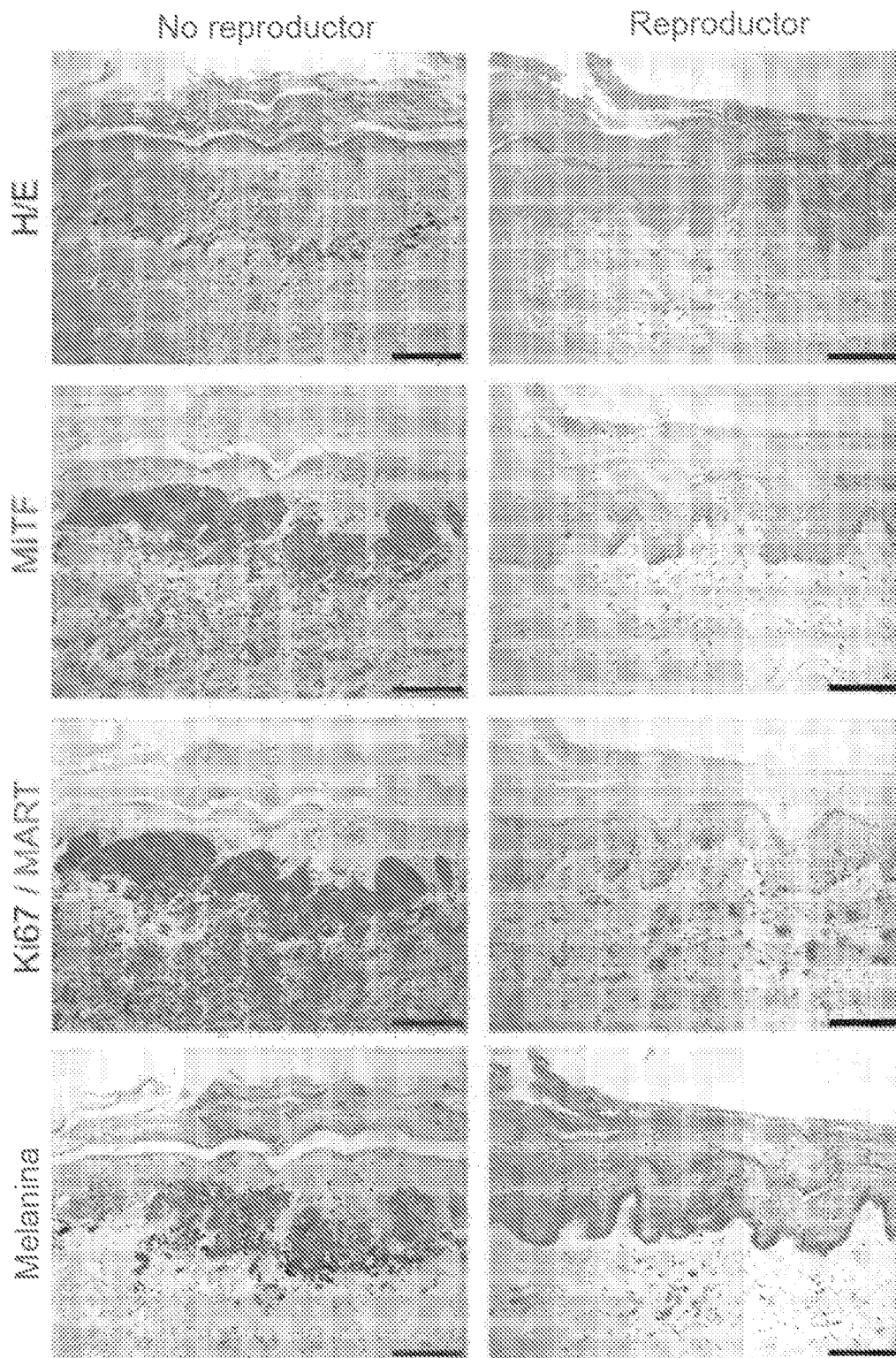


FIG. 8C

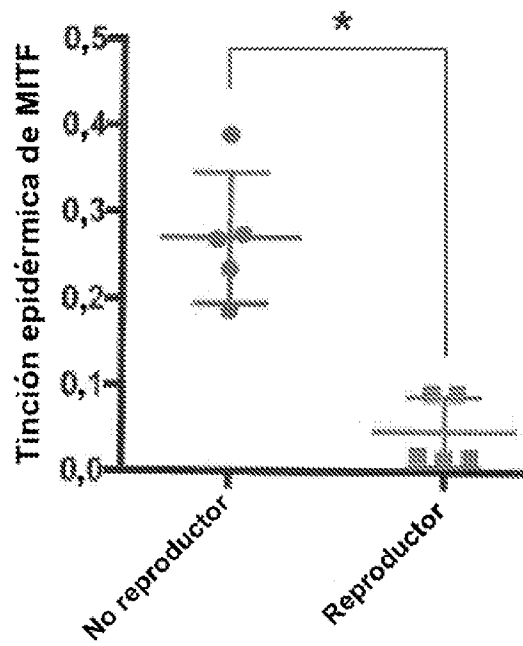


FIG. 8D

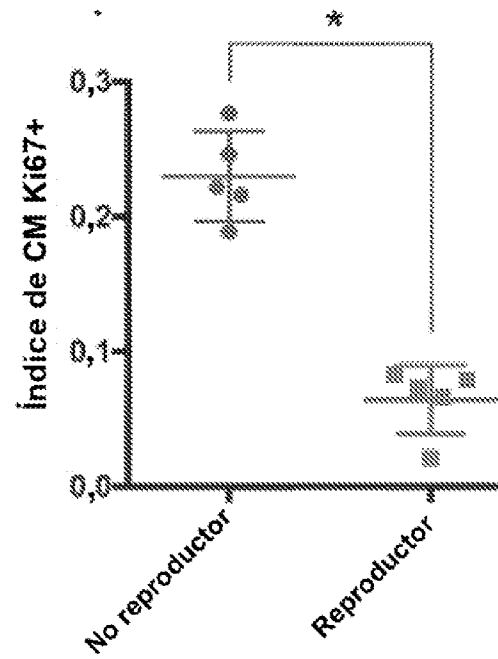


FIG. 8E

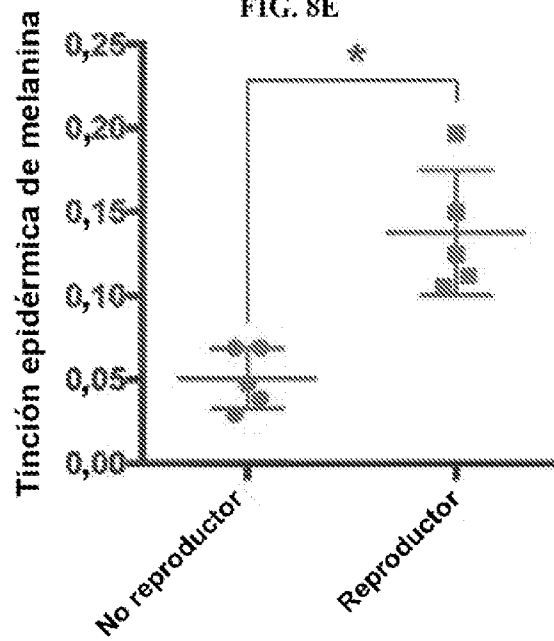


FIG. 9

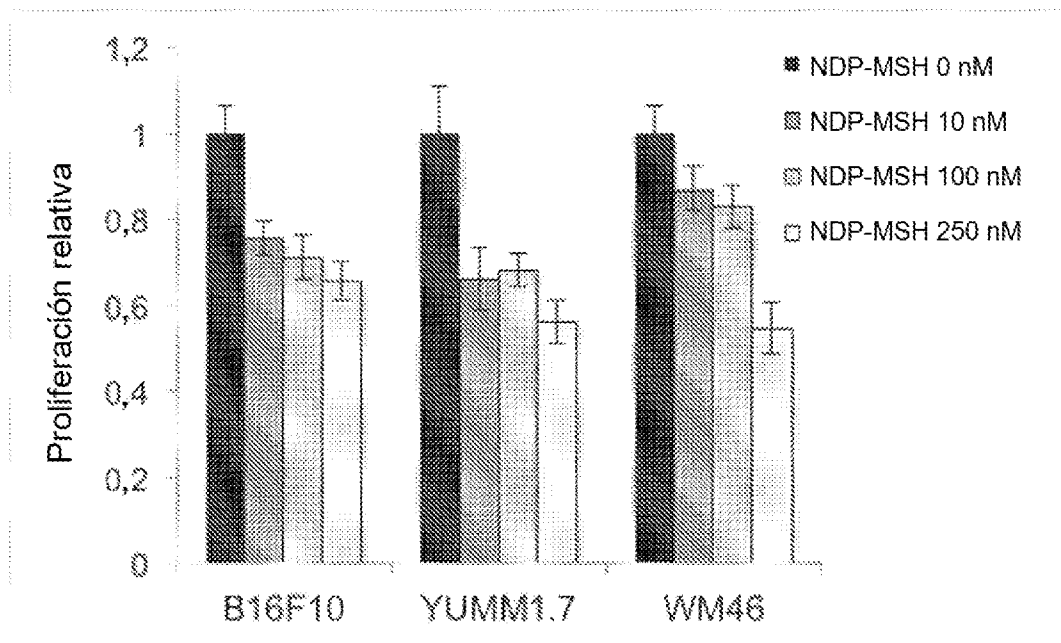
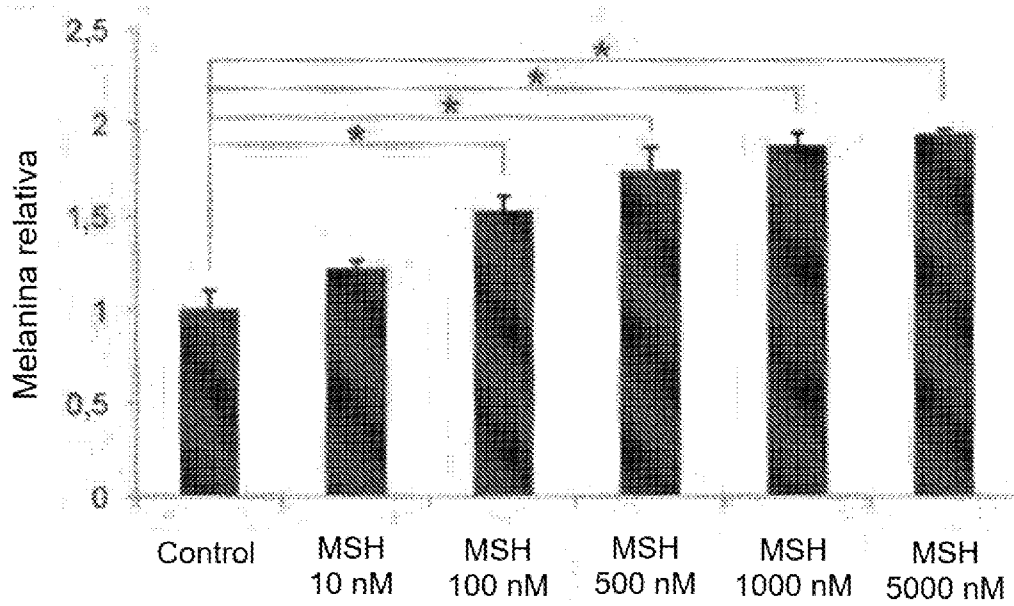


FIG. 10A

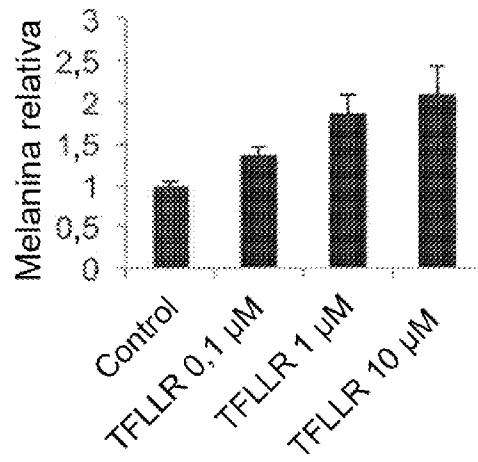


FIG. 10B

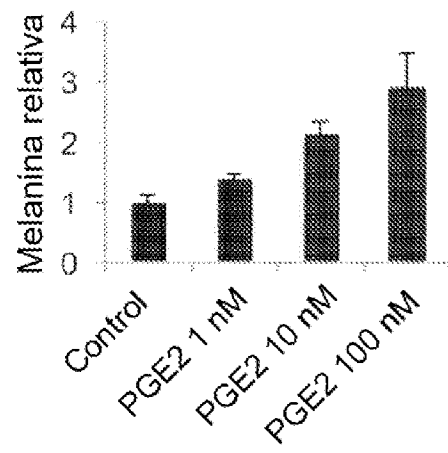


FIG. 10C

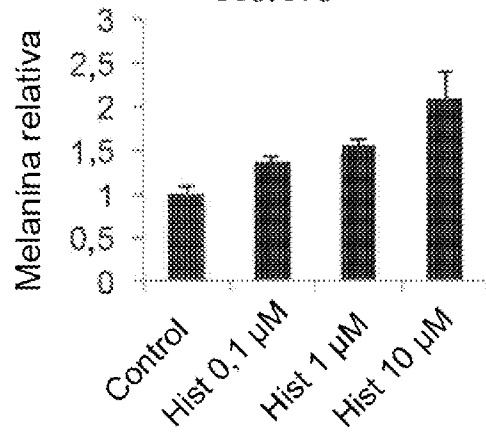


FIG. 10D

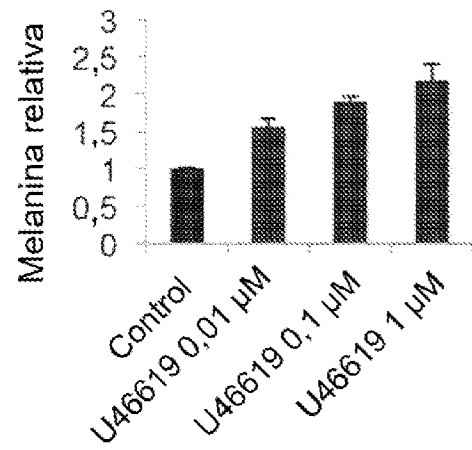


FIG. 11A

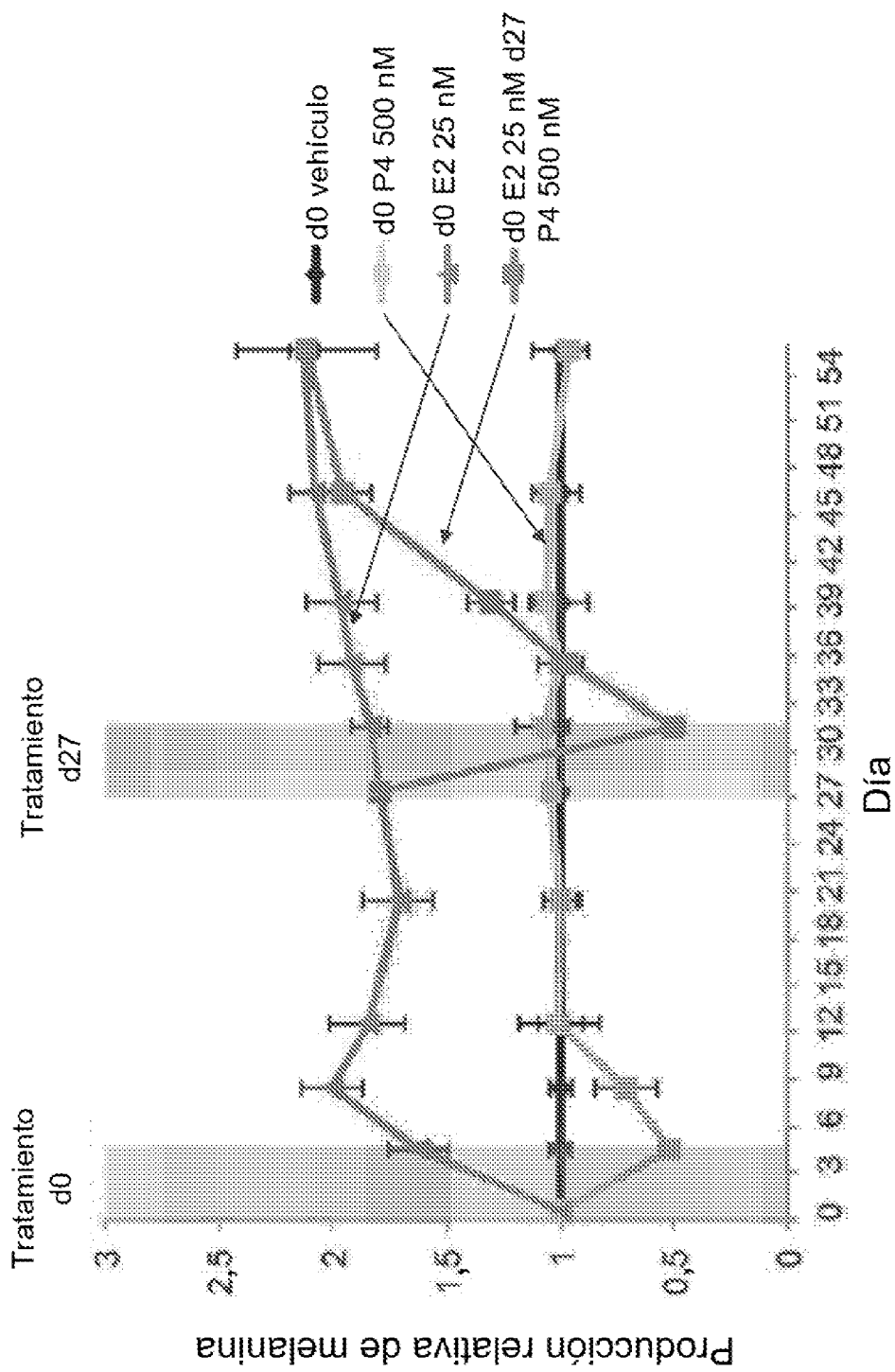


FIG. 11B

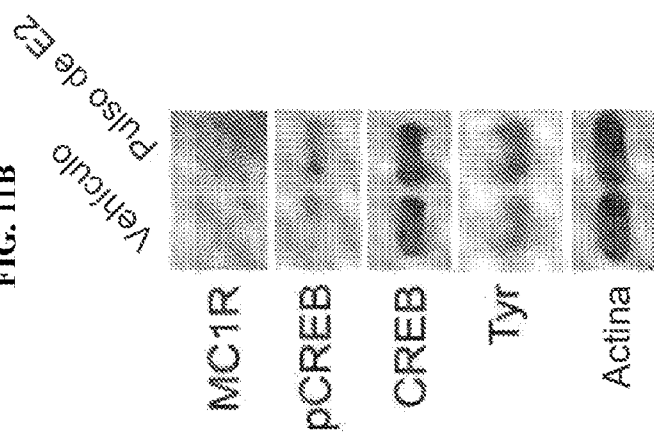


FIG. 11C

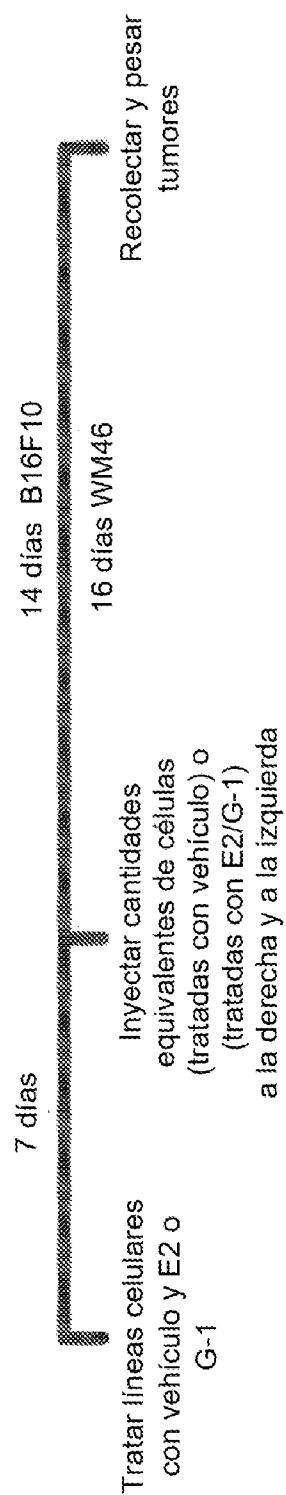


FIG. 11D

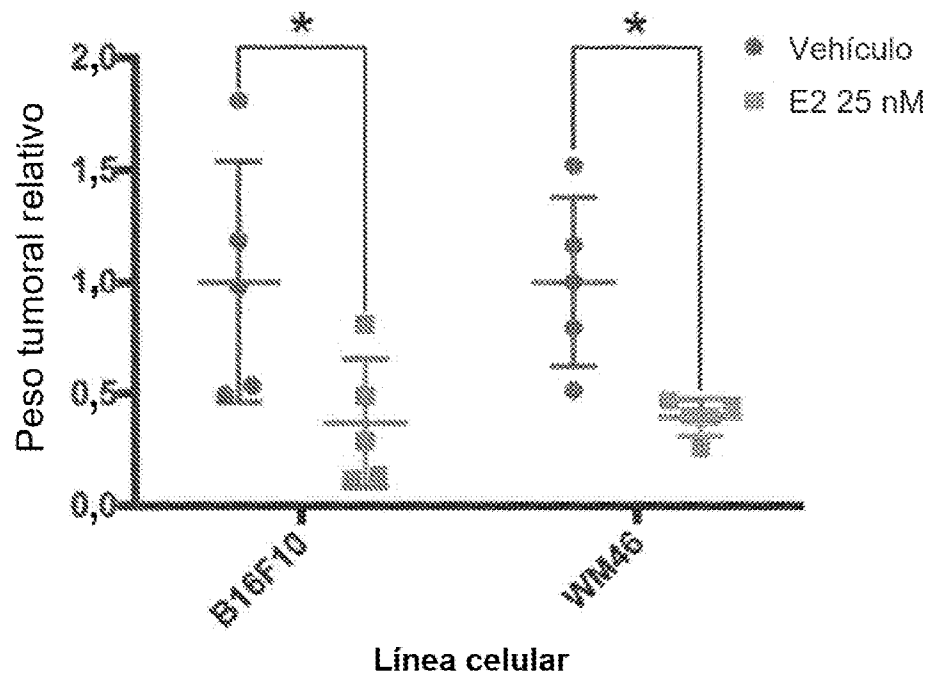
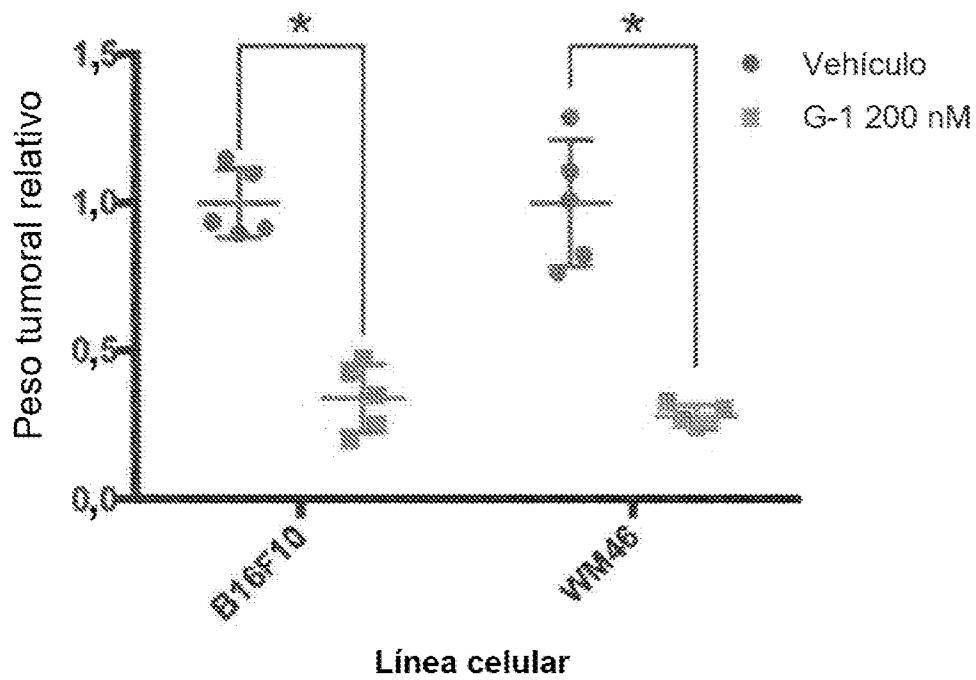
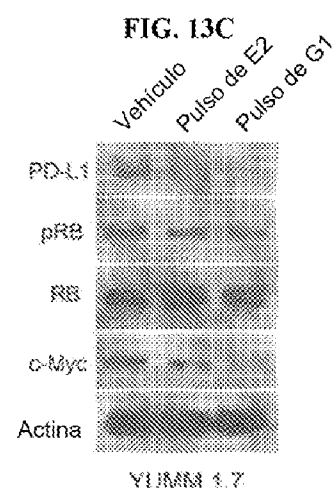
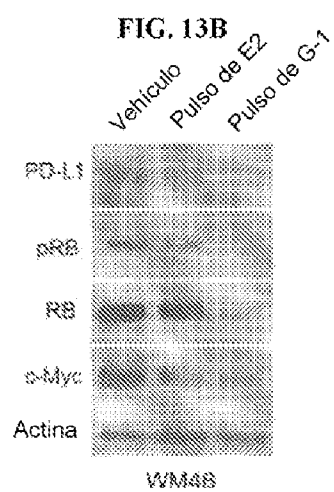
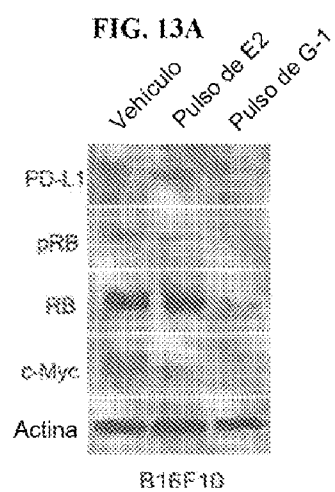
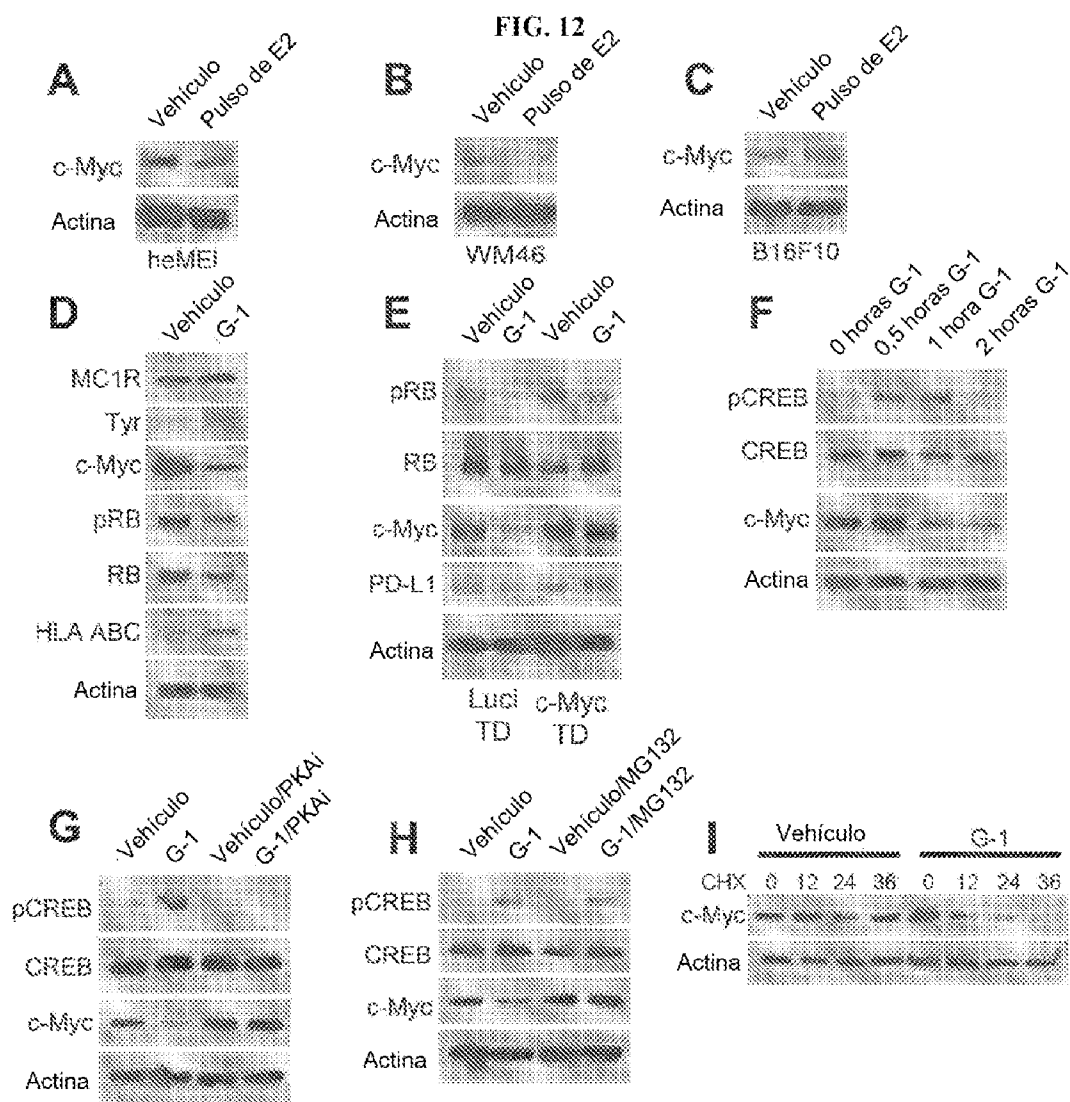


FIG. 11E





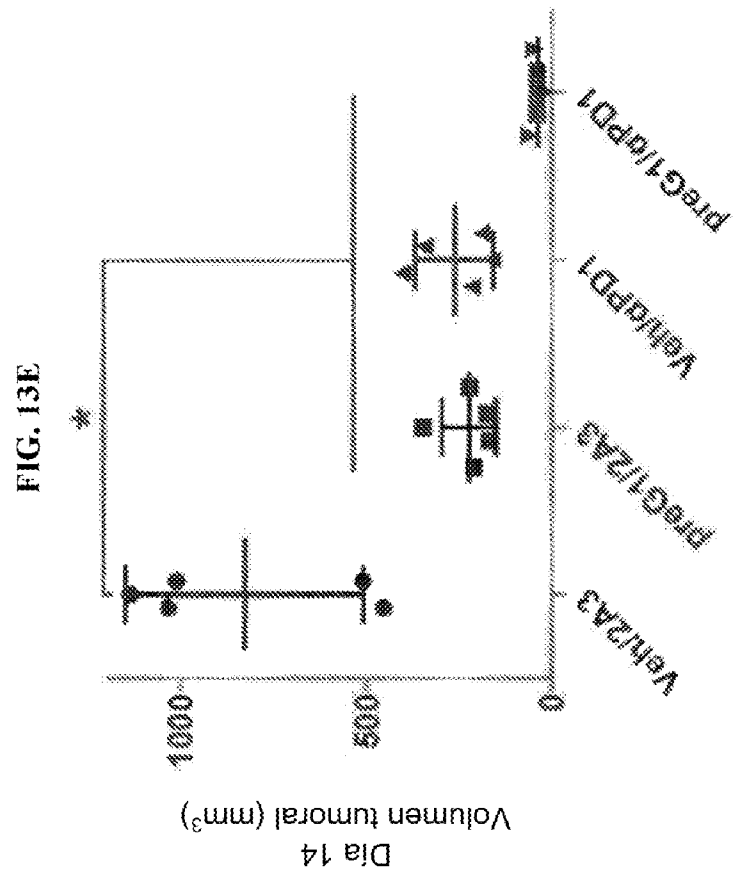
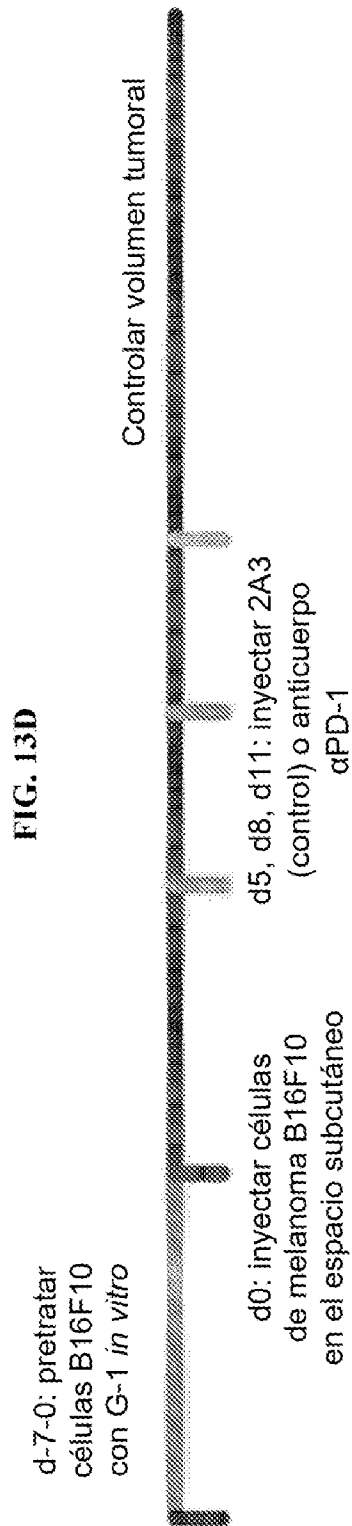


FIG. 13F

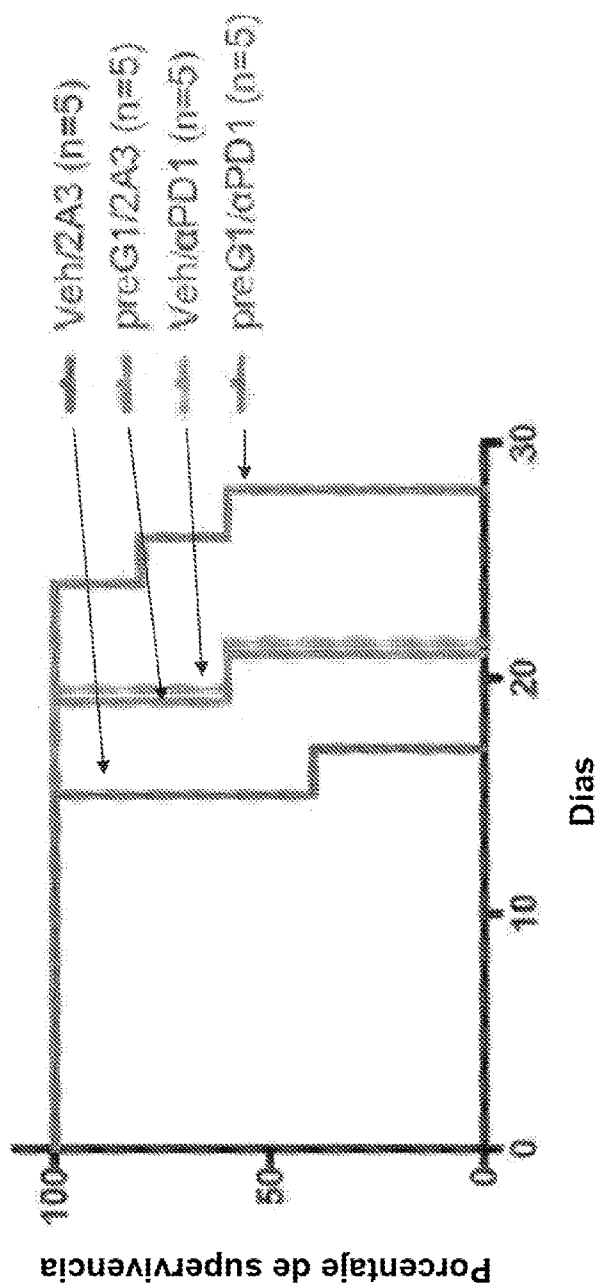


FIG. 13G

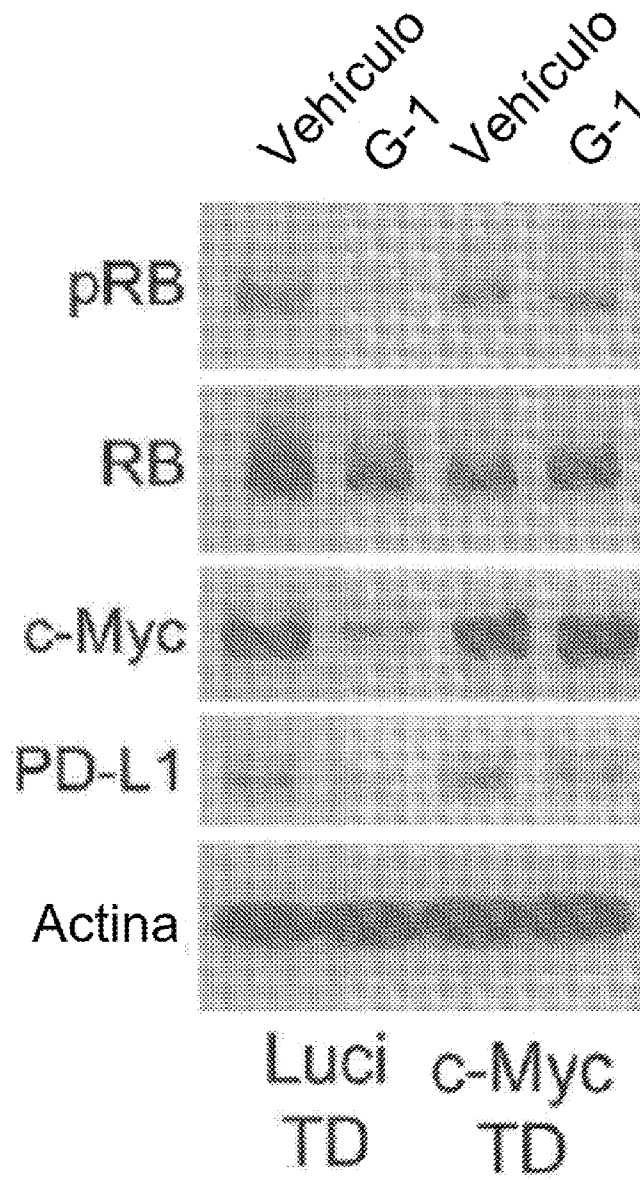


FIG. 14A

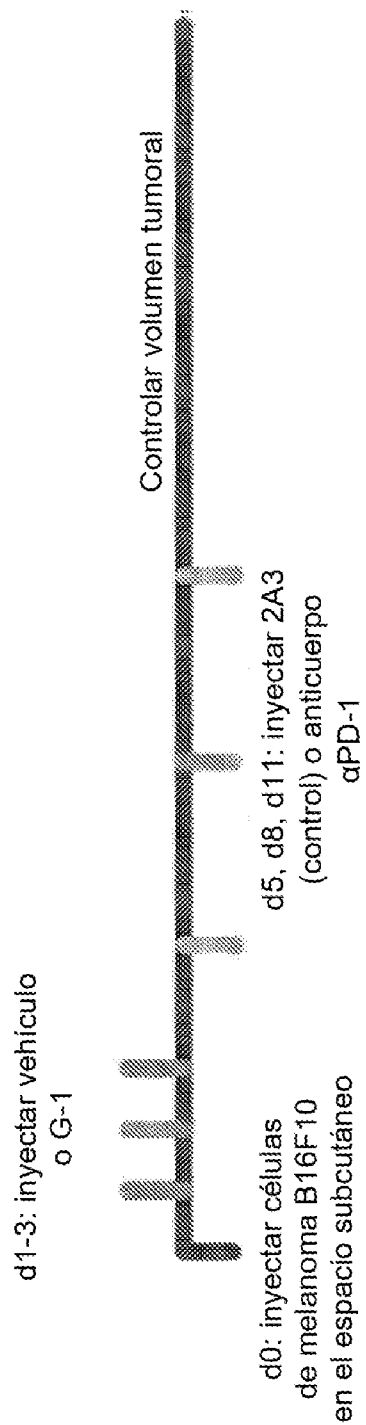


FIG. 14B

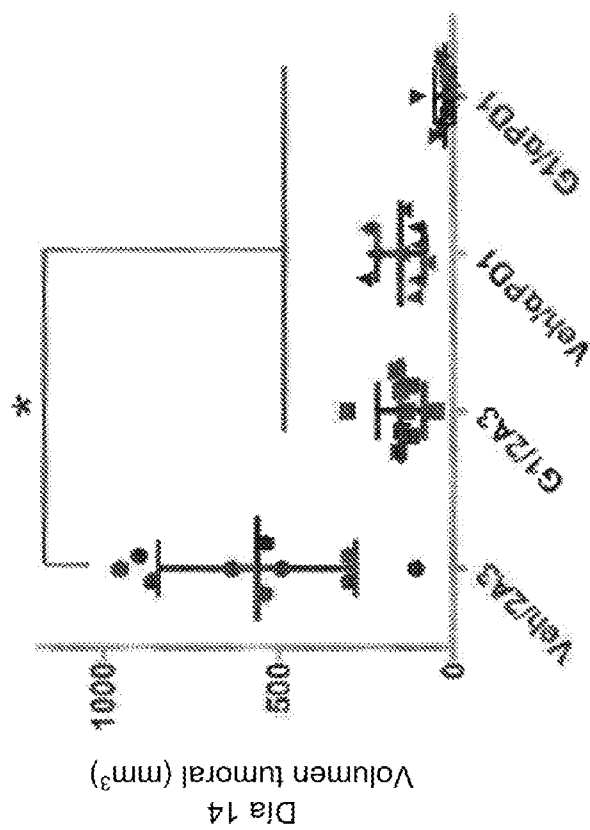
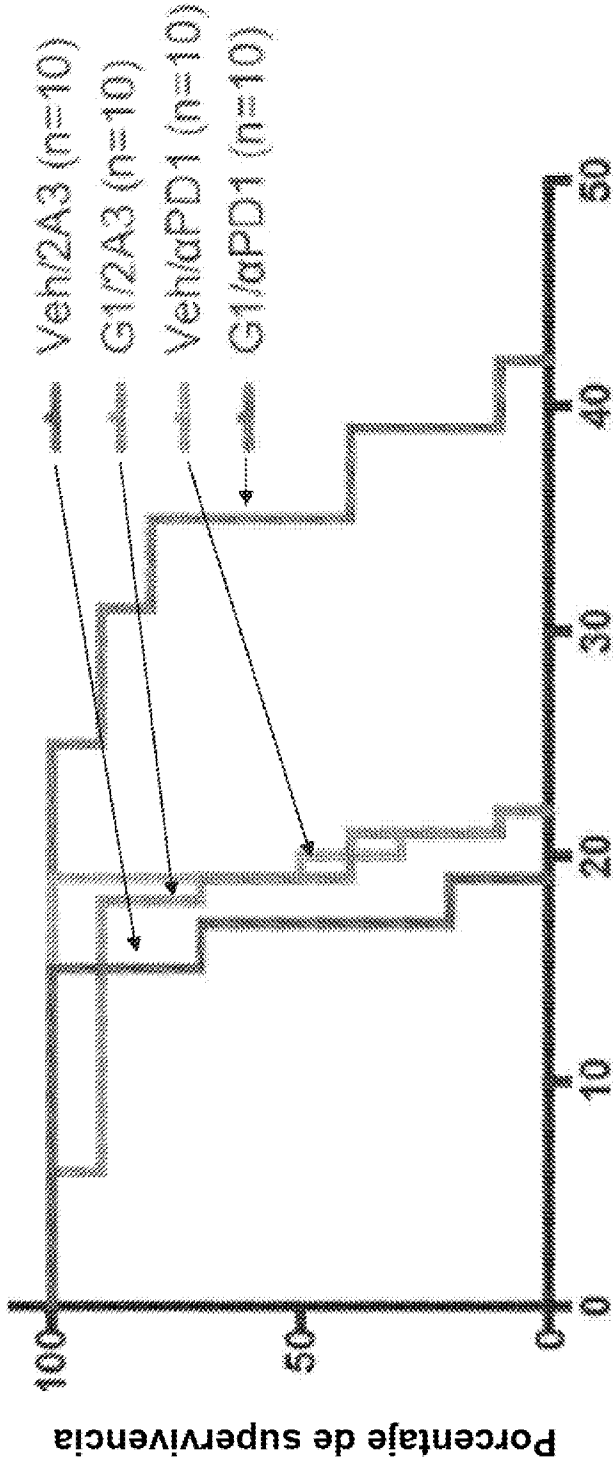


FIG. 14C



Día

Valores de p	Veh/2A3	G1/2A3	Veh/αPD1	G1/αPD1
Veh/2A3	1	0,0073	0,0002	<0,0001
G1/2A3		1	0,4768	<0,0001
Veh/αPD1			1	<0,0001
G1/αPD1				1
Prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox)				

FIG. 14D

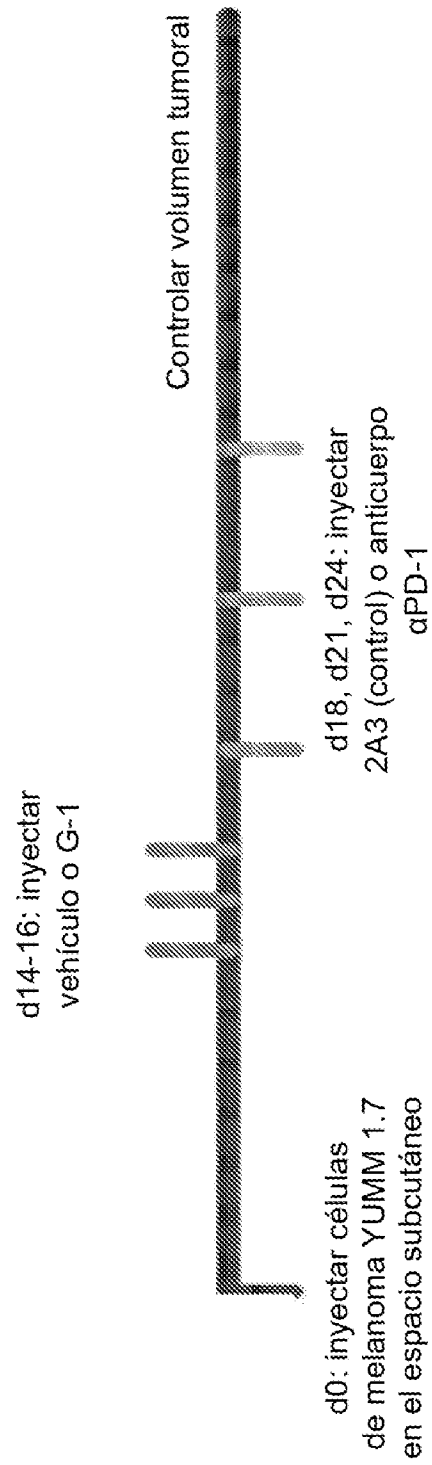


FIG. 14E

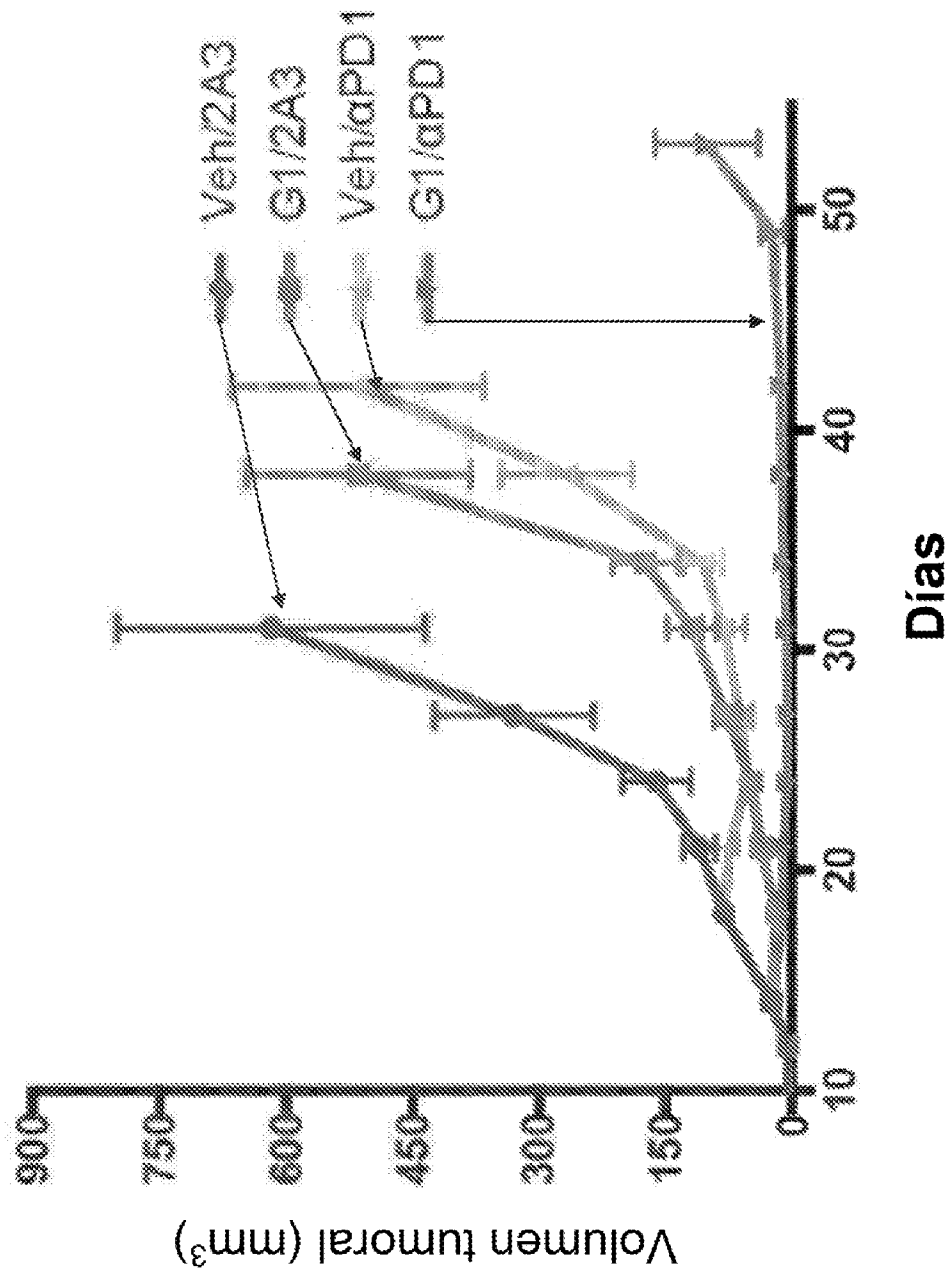
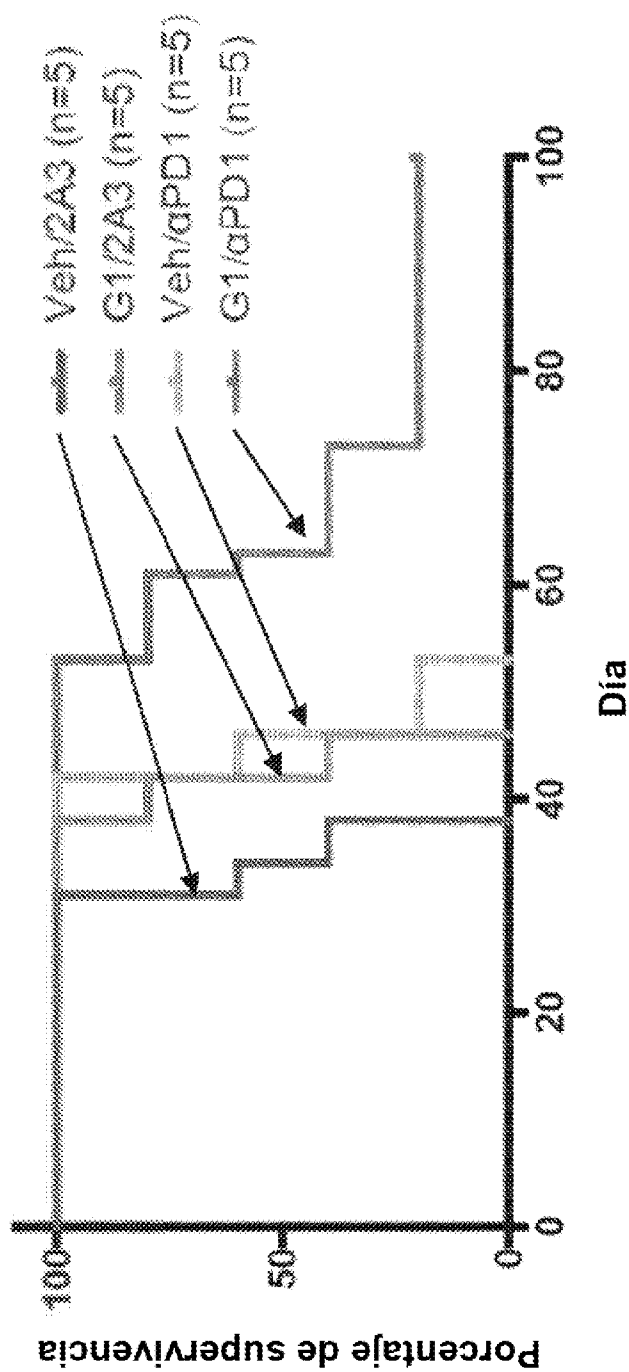


FIG. 14F



Valores de p	Veh/2A3	G1/2A3	Veh/aPD1	G1/aPD1
Veh/2A3	1	0,0079	0,0025	0,0025
G1/2A3		1	0,2862	0,0026
Veh/aPD1			1	0,0048
G1/aPD1				1
Prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox)				

FIG. 15A

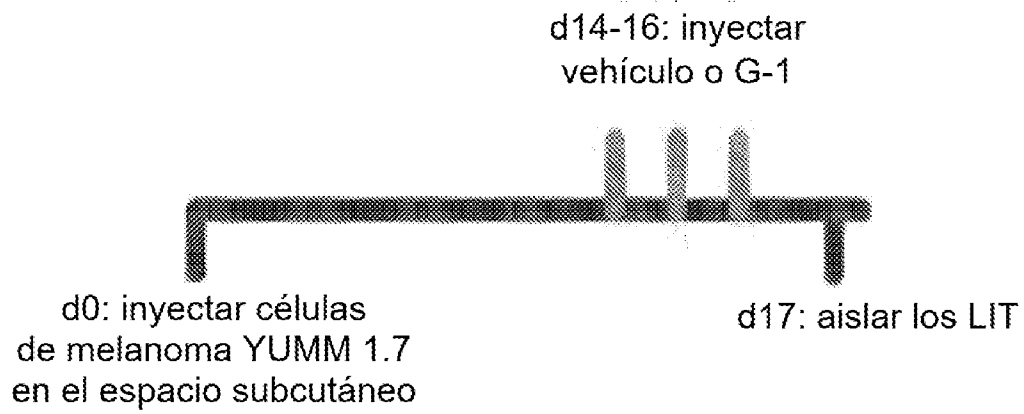


FIG. 15B

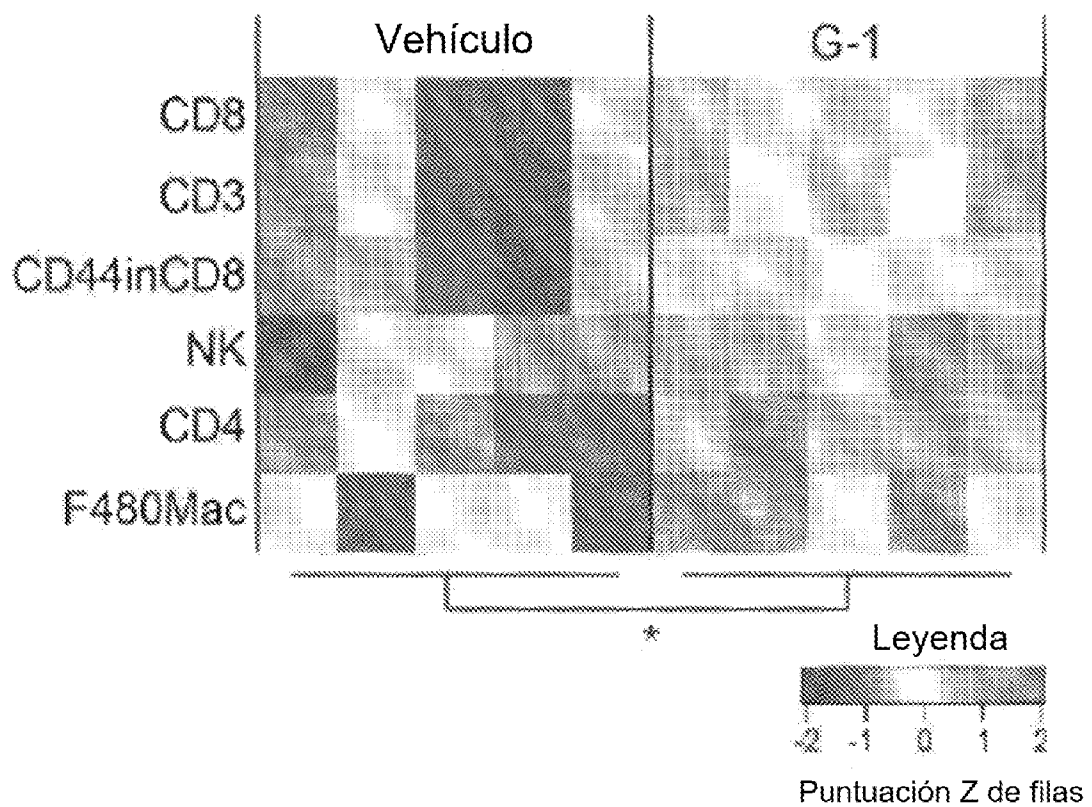


FIG. 15C

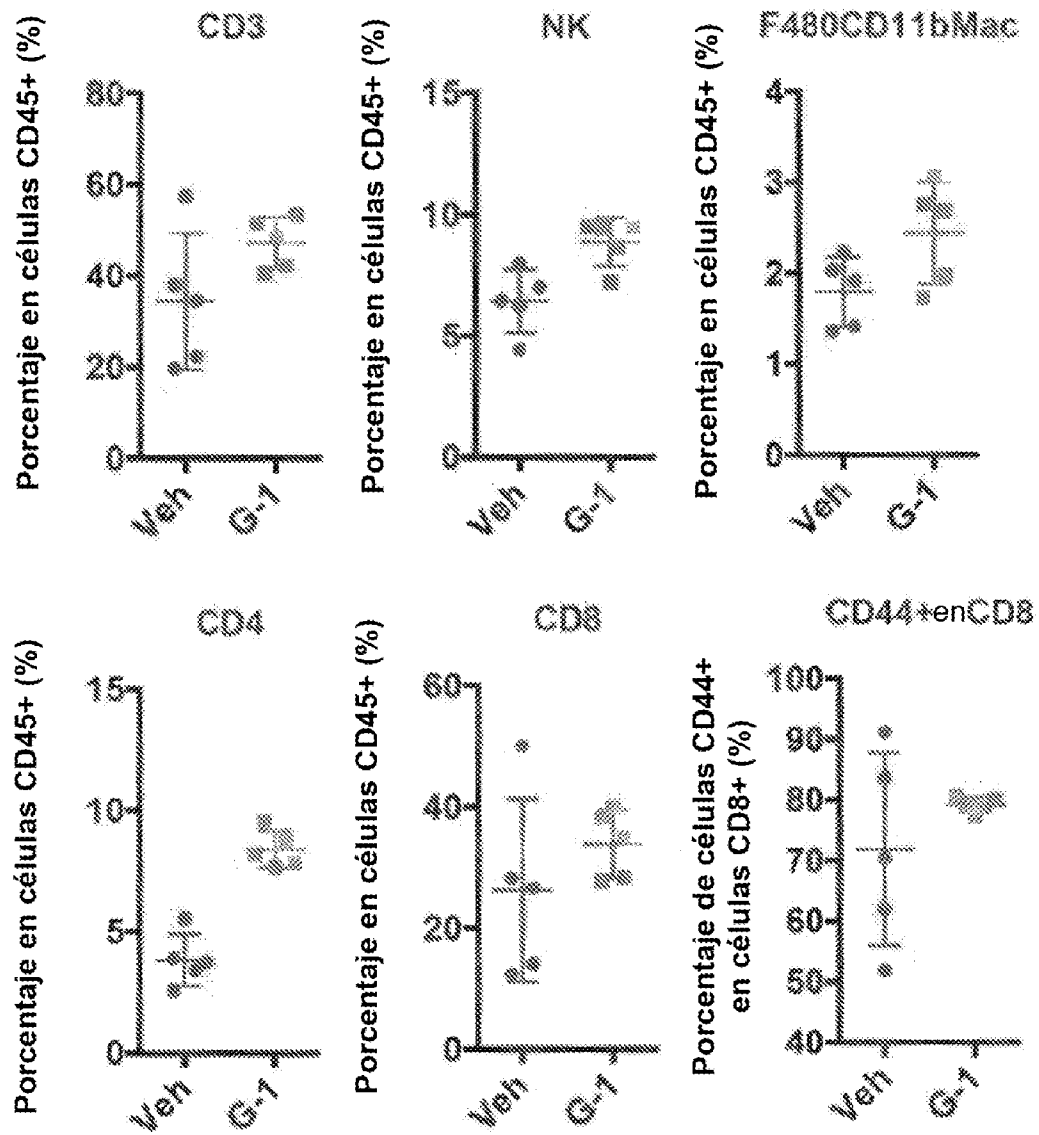


FIG. 16A

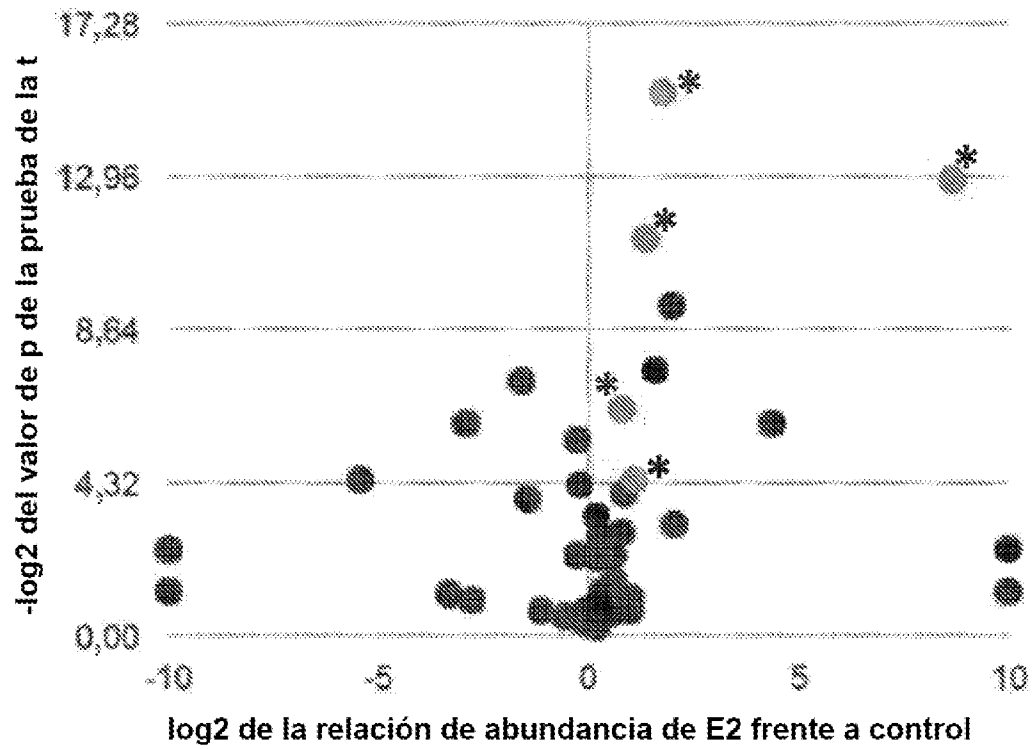


FIG. 16B

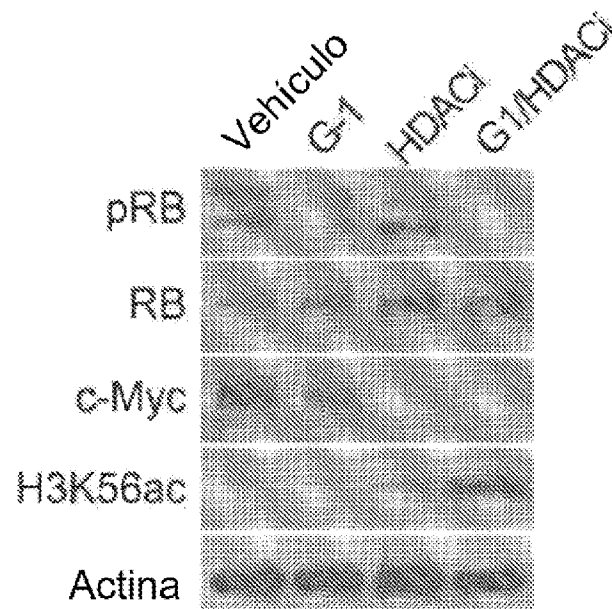


FIG. 16B

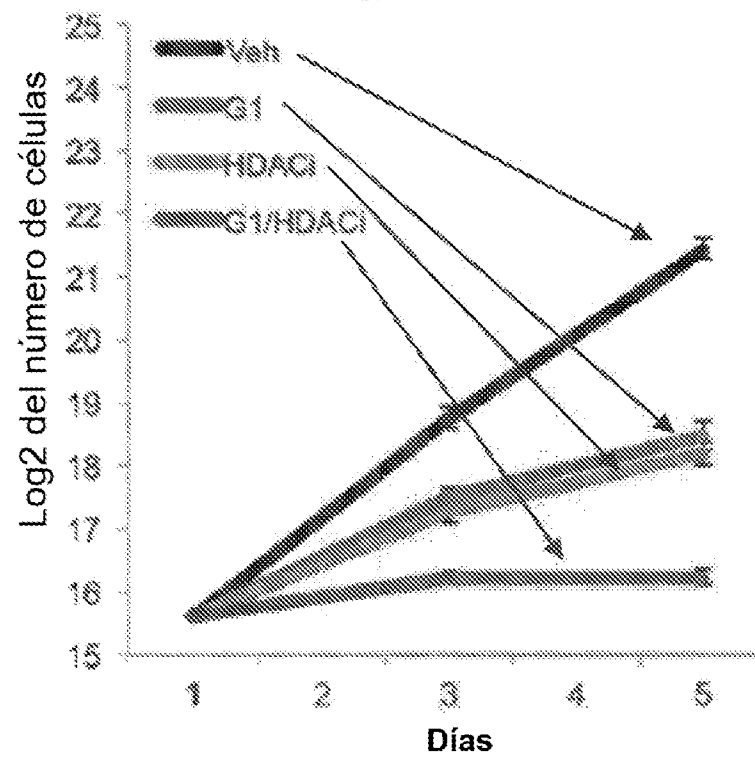


FIG. 17A

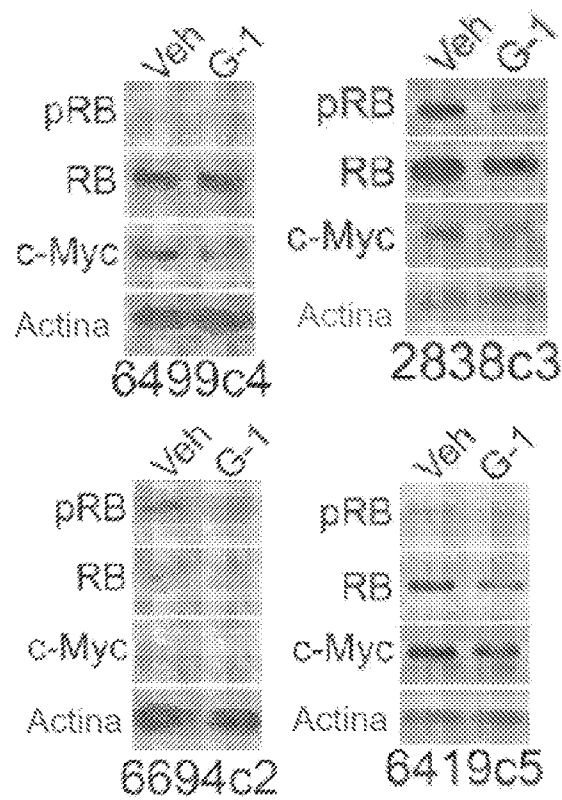


FIG. 17B

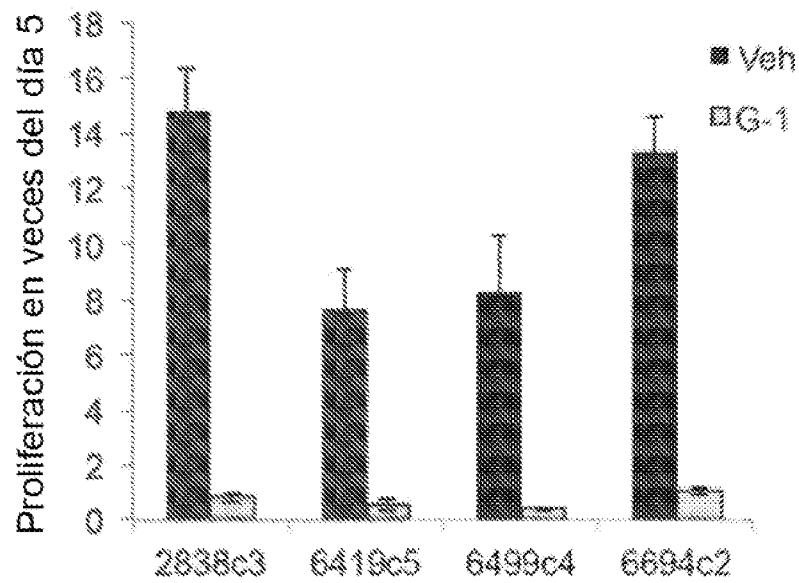


FIG. 17C

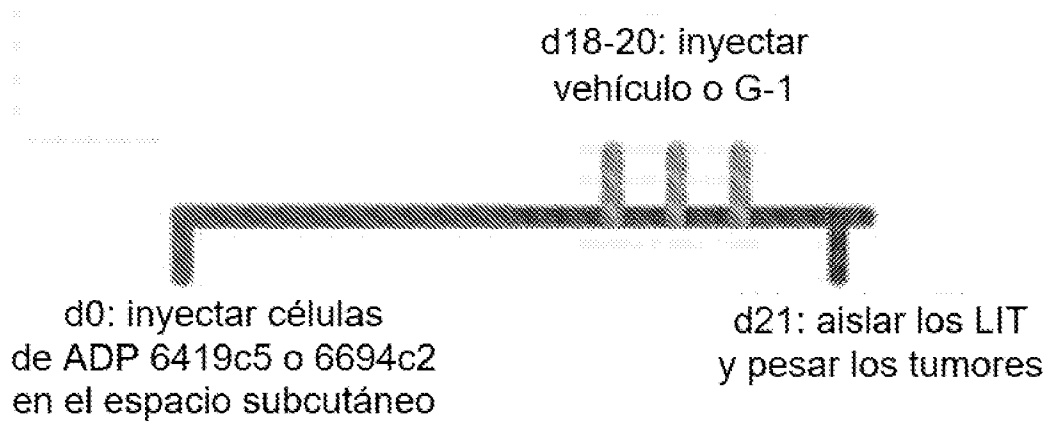


FIG. 17D

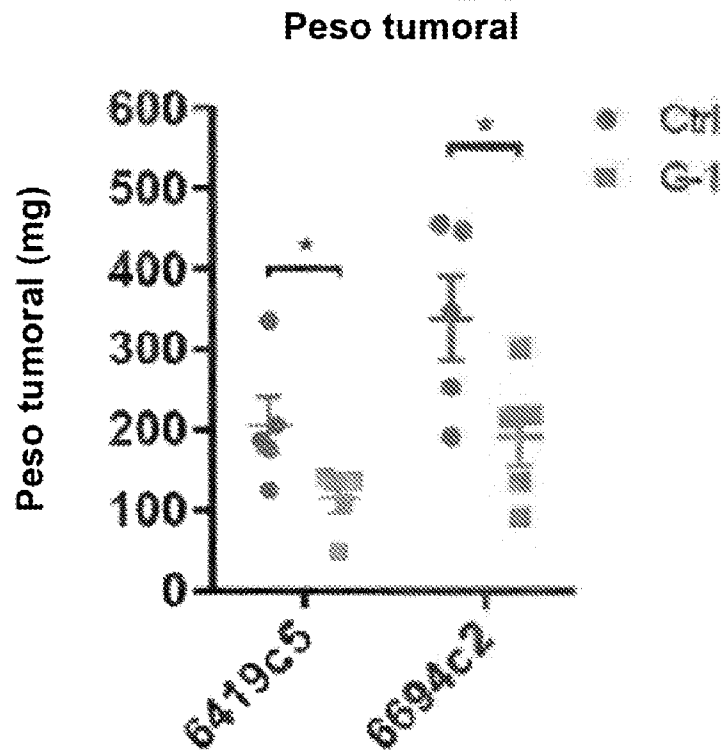


FIG. 18A

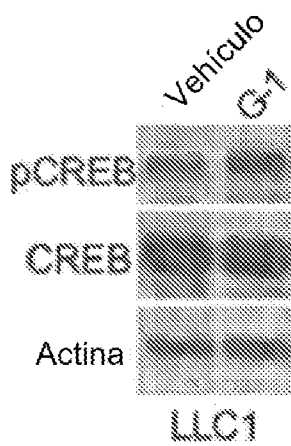
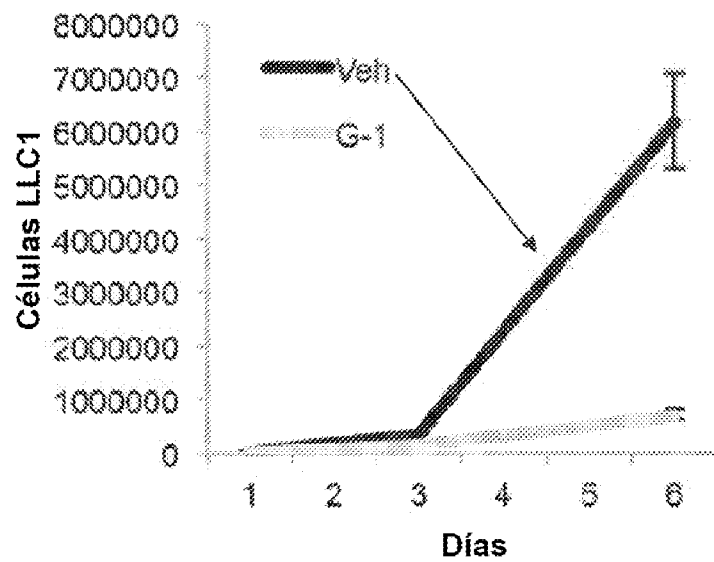
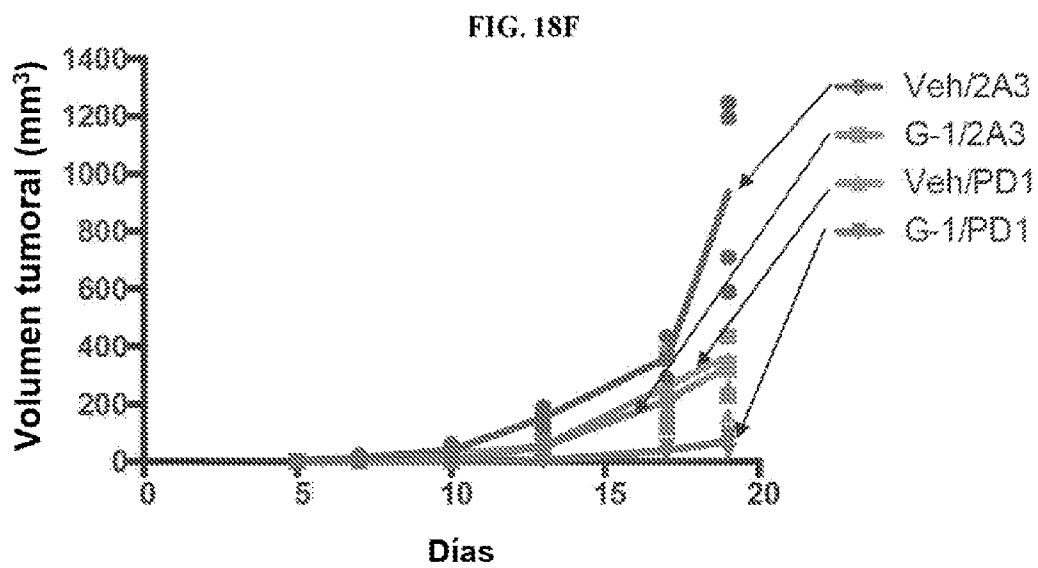
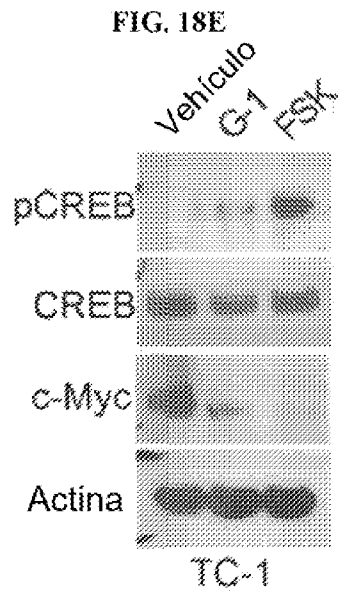
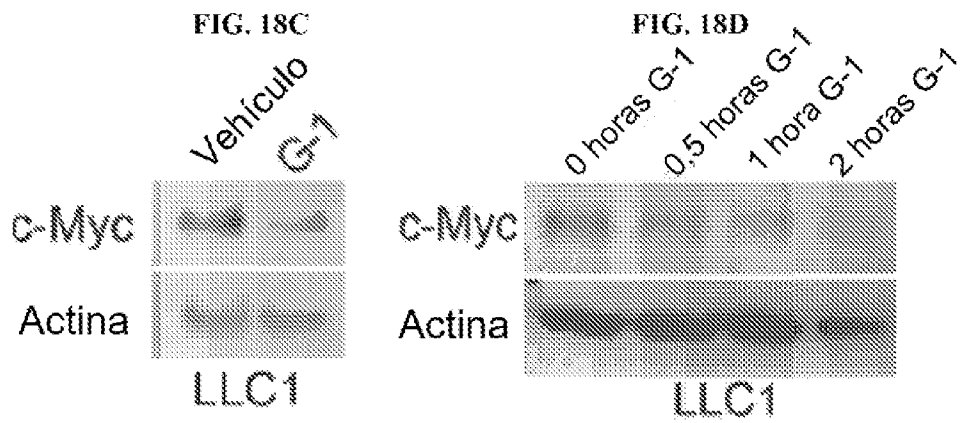
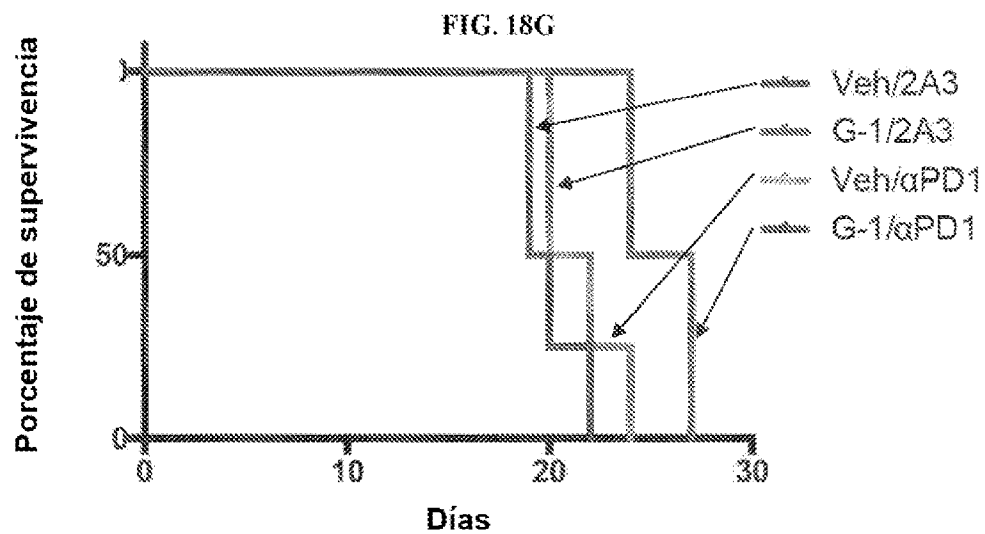


FIG. 18B







Valores de p	Veh/2A3	G1/2A3	Veh/αPD1	G1/αPD1
Veh/2A3	1	0,2719	0,1934	0,0082
G1/2A3		1	0,3043	0,0084
Veh/αPD1			1	0,0285
G1/αPD1				1
n = 4 ratones; prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox)				

FIG. 19