

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 939 490**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2020 PCT/EP2020/060054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2020 WO20208088**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2020 E 20730185 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2022 EP 3953393**

54 Título: **Combinación farmacéutica de un antagonista de EP4 e inhibidores de puntos de control inmunitarios para el tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

**09.04.2019 EP 19168253**

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

**24.04.2023**

73 Titular/es:

**ROTTAPHARM BIOTECH S.R.L. (100.0%)  
Via Valosa di Sopra 9  
20900 Monza, IT**

72 Inventor/es:

**ROVATI, LUCIO CLAUDIO;  
GIORDANI, ANTONIO;  
MAGARACI, FILIPPO;  
CASELLI, GIANFRANCO;  
PIEPOLI, TIZIANA;  
MAGGIONI, DANIELE y  
BONAZZI, ALBINO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 939 490 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

Combinación farmacéutica de un antagonista de EP4 e inhibidores de puntos de control inmunitarios para el tratamiento de tumores

### Campo de la invención

5 La presente invención proporciona una combinación farmacéutica de un antagonista de EP4 e inhibidores de puntos de control inmunitarios para tratar tumores.

En un aspecto preferido, la invención se refiere a un polimorfo del antagonista de EP4 de la combinación de la invención.

### Antecedentes de la invención

10 El cáncer es una gran amenaza para la salud pública mundial y sigue siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Por lo tanto, a pesar de los avances recientes en la terapia, existe una necesidad médica urgente para el desarrollo de tratamientos terapéuticos más efectivos.

15 La inmunooncología es un área de investigación innovadora que tiene como objetivo aprovechar el sistema inmunitario del paciente para combatir el cáncer. Uno de los enfoques más prometedores para prevenir la supresión de la inmunidad contra el cáncer es el bloqueo de los puntos de control inmunitarios, es decir, las vías moleculares evolucionadas para prevenir la autoinmunidad mediada por células T, pero que los tumores también pueden aprovechar en su beneficio. En los tumores, la expresión de estas proteínas está desregulada. Por este motivo, una importante línea de investigación se ha centrado en los inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICI) para bloquear los receptores inhibidores expresados en las células T, como la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) o sus ligandos correspondientes expresados en células tumorales, como el ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1). (Alsaab, H.O. et al. Front. Pharmacol. 8, 1-15 (2017)). El documento WO 2018/084230 describe el uso de antagonistas del receptor EP4 para el tratamiento del cáncer de hígado asociado con NASH.

25 La FDA ha aprobado ahora diferentes medicamentos contra el cáncer centrados en los inhibidores del punto de control anti CTLA-4 y PD-1/PD-L1. Estos incluyen anticuerpos monoclonales contra PD-1 y CTLA-4, como pembrolizumab, nivolumab, durvalumab, tremelimumab e ipilimumab. La inmunoterapia contra el cáncer mediante el bloqueo de moléculas de puntos de control inmunitarios ha demostrado una eficacia clínica notable en múltiples tipos de cáncer; además, los ensayos clínicos de inmunoterapia de puntos de control inmunitarios han mostrado buenos resultados incluso para cánceres metastásicos avanzados. (Alsaab, H.O. et al. Front. Pharmacol. 8, 1-15 (2017)). A pesar de un éxito incuestionable, no todos los pacientes responden, probablemente porque el cáncer puede encontrar otras formas de escapar de la vigilancia inmunológica. Estas limitaciones han impulsado a los médicos hacia nuevos agentes antitumorales o nuevas terapias que son más eficaces contra la vigilancia inmunológica.

### Sumario de la invención

Los inventores descubrieron sorprendentemente que una combinación de un antagonista de EP4 y al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios es eficaz en el tratamiento de tumores.

35 Por tanto, la invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende el antagonista de EP4 de fórmula ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico o una sal farmacéuticamente aceptable y al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios.

40 El antagonista de EP4 se describió por primera vez en el documento WO2013/004290 comprendido en una fórmula general. Los inventores descubrieron sorprendentemente que el antagonista de EP4 de fórmula ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico era el único que, combinado con un inhibidor de puntos de control, fue capaz de tratar tumores de manera eficaz, como será evidente en la parte experimental.

Cuando en la presente invención se utiliza la definición de "punto de control inmunitario", se entiende como una molécula accesoria capaz de activar rutas celulares en células inmunitarias o en células cancerosas que promueven o inhiben la activación de células T.

45 Cuando en la presente invención se utiliza la definición de "inhibidor de puntos de control inmunitarios", se entiende como una molécula que inhibe la función de un punto de control inmunitario.

50 Los inventores descubrieron sorprendentemente que la sal de sodio del antagonista de EP4 ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico era la preferida para preparar la combinación. Como quedará claro de la parte experimental, la sal de sodio del ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico tal como se obtuvo era un compuesto amorfo. Sorprendentemente, los inventores descubrieron una forma cristalina muy estable de (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoato sódico denominada Forma A que permitía tratar cánceres por sí sola, preferiblemente cuando se combinaba con al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una forma polimórfica A de la sal sódica de ácido (R)-4-(1-(6-(4-

(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico caracterizada por un espectro de XRD de polvo con picos en valores del ángulo  $2\theta \pm 0,2^\circ$  de 4,3, 5,0, 5,8, 6,4, 7,1, 8,3, 8,7, 12,8, 15,3, 15,9.

La invención se refiere además a la forma polimórfica A de la sal sódica del ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico para el uso como un medicamento, preferiblemente para el uso en el tratamiento de tumores. Por tanto, la combinación farmacéutica comprende preferentemente la forma polimórfica A de la sal sódica de ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico y al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios. En otro aspecto, la invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende el antagonista de EP4 seleccionado de ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico o una sal farmacéuticamente aceptable y al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios.

En otro aspecto, la invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende el antagonista de EP4 que consiste en la Forma A cristalina de (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoato de sodio y al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios para su uso en el tratamiento de tumores.

### 15 Descripción de las figuras:

La Figura 1 muestra el gráfico de DSC de la forma cristalina A del (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5] octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoato de sodio del Ejemplo 1.

La Figura 2 informa del espectro IR de la forma cristalina A de (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5] octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoato de sodio del Ejemplo 1.

La Figura 3 informa de las respuestas antitumorales de la forma cristalina A de (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoato de sodio del Ejemplo 1, y del compuesto de comparación del ejemplo 2 y anti-PD-1 en modelos tumorales CT26. A los ratones Balb/c se les inyectaron por vía subcutánea  $1 \times 10^6$  células CT26. Después de medir los tumores en el día 7, los ratones se aleatorizaron y luego se trataron con la terapia designada. El Compuesto 1 y el compuesto de ejemplo 2 se administraron por vía oral a razón de 30 mg/kg al día. Se inyectaron anticuerpos anti PD-1 a 20 mg/kg en el día 8 y 10 mg/kg en el día 13, el día 19 y el día 23 después del trasplante. Los volúmenes tumorales se midieron dos veces por semana y se muestran como la media  $\pm$  EE de 15 ratones por grupo. Las flechas indican las inyecciones anti-PD-1 (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , prueba Anova).

La Figura 4 informa de las respuestas antitumorales del compuesto, anti-PD-1 y la terapia combinada en modelos tumorales CT26. A los ratones Balb/c se les inyectaron por vía subcutánea  $1 \times 10^6$  células CT26. Después de medir los tumores en el día 7, los ratones se aleatorizaron y luego se trataron con la terapia designada. El Compuesto 1 y el Compuesto 2 se administraron por vía oral a razón de 30 mg/kg al día. Se inyectaron anticuerpos anti PD-1 a 20 mg/kg en el día 8 y 10 mg/kg en el día 13, el día 19 y el día 22 después del trasplante. Los volúmenes tumorales se midieron dos veces por semana y se muestran como la media  $\pm$  EE de 15 ratones por grupo. Las flechas indican las inyecciones anti-PD-1 (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , prueba Anova).

La Figura 5 informa del cambio de peso corporal relativo a lo largo del tratamiento con el Compuesto 1, el compuesto del ejemplo 2, anticuerpos anti PD-1 y terapia de combinación. El peso de los ratones se midió dos veces por semana.

La Figura 6 informa de la inversión dependiente de la concentración *in vitro* del efecto de PGE2 mediante el Compuesto 1.

La Figura 7 informa de la liberación de TNF- $\alpha$  *ex vivo* inducida por LPS: relación lineal entre la inhibición por PGE2 ( $CI_{50}$ ) y la dosis de tratamiento del Compuesto 1. Análisis de regresión lineal,  $R^2 = 0,9268$ ; Valor p para la desviación de la pendiente a cero = 0,0086.

La Figura 8 informa de la inhibición *ex vivo* de la liberación de TNF- $\alpha$  en cultivo de sangre completa estimulada por LPS. Efecto inhibitor de PGE2 a 0,03  $\mu$ M y 0,1  $\mu$ M después de la administración del vehículo o del Compuesto 1 a dosis que oscilan entre 10 mg/kg y 300 mg/kg. Análisis ANOVA bidireccional; \*\* $p < 0,001$  frente al vehículo; \*\*\* $p < 0,0005$  frente al vehículo, prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

La Figura 9 informa de la inhibición *ex vivo* de la liberación de TNF- $\alpha$  en muestras de sangre completa en diferentes momentos de la dosificación y estimulada *ex vivo* por LPS. Efecto inhibitor de PGE2 a 0,03  $\mu$ M y 0,1  $\mu$ M después de la administración del vehículo o 10 mg/kg del Compuesto 1. Análisis ANOVA bidireccional; \*\*\* $p < 0,0005$  frente al vehículo, prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

La Figura 10 informa de la distribución de valores de  $CI_{50}$  de PGE2: efecto del Compuesto 1 (10 mg/kg) y del Compuesto 2 (10 mg/kg) después de la administración oral única (24 horas después de la dosificación). ANOVA unidireccional, \*  $p < 0,001$  frente a la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett del vehículo.

La Figura 11 informa de la distribución de valores de  $CI_{50}$  de PGE2: Efecto del Compuesto 1 a 10 mg/kg después de la administración oral repetida (una vez al día durante 8 días). \* $P < 0.001$  frente al vehículo, prueba de Mann Withney.

5 La Figura 12 informa que el Compuesto 1 invierte de forma dependiente de la dosis la inhibición inducida por PGE2 de la expresión del gen TNF- $\alpha$  en células THP-1 humanas diferenciadas en macrófagos y estimuladas con LPS a 10 ng/ml más PGE2 0,01  $\mu$ M. Los resultados se expresan como el porcentaje medio de expresión de TNF- $\alpha$   $\pm$  DE de experimentos independientes realizados por triplicado. (Lipopolisacárido LPS, PGE2 Prostaglandina E2).

10 La Figura 13 informa que el Compuesto 1 inhibió la expresión del gen RANKL en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 estimulada con PGE2 10  $\mu$ M. Los resultados se expresan como el porcentaje medio de expresión de RANK-L  $\pm$  DE de experimentos independientes realizados por triplicado. \* $P < 0,05$  mediante análisis de varianza unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. PGE2 Prostaglandina E2.

15 La Figura 14 informa que el Compuesto 1 disminuyó de forma dependiente de la dosis la frecuencia de Th-17 en células PBMC humanas inducidas hacia una diferenciación de células Th-17 por exposición a IL-2, IL-21, anticuerpos anti CD3 y CD28 y PGE2 0,03  $\mu$ M. (Las células Th-17 se clasificaron como CD4+CCR6+CD45Ro-IL17F+).

La Figura 15 informa que el Compuesto 1 disminuyó la frecuencia de células Th-3 en células PBMC humanas inducidas hacia la diferenciación Treg por exposición a rIL23 y rIL-1 $\beta$  (10 ng/ml) y tratadas con PGE2 0,03  $\mu$ M  $\pm$  Compuesto 1 0,1  $\mu$ M. En el gráfico, se informa de la media y la desviación estándar. \*  $p < 0,05$ , Anova unidireccional. (Las células Th-3 se seleccionaron como CD3+CD4+FoxP3+CD25low+TGFb+)

20 La Figura 16 informa que el Compuesto 1 disminuyó la frecuencia de células reguladoras iTTr35 en células PBMC humanas inducidas hacia la diferenciación Treg por exposición a rIL23 y rIL-1 $\beta$  (10 ng/ml) y tratadas con PGE2 0,03  $\mu$ M  $\pm$  Compuesto 1 0,1  $\mu$ M. En el gráfico, se informa de la media y la desviación estándar. \*  $p < 0,05$ , Anova unidireccional. (Las células iTTr35 se clasificaron como CD3+CD4+IL35+).

#### Descripción detallada de la invención

25 La invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende el antagonista de EP4 de fórmula ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios.

30 La combinación de la invención puede comprender una sal farmacéuticamente aceptable del antagonista de EP4 ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico. La sal se puede seleccionar del grupo que consiste en clorhidrato, sal de sodio, sal de potasio y sal de litio. Preferiblemente según la invención la sal de la combinación es la sal de sodio.

Como quedará claro a partir de la parte experimental, la sal de sodio del ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico tal como se obtuvo era un compuesto amorfo.

35 Sorprendentemente, los inventores descubrieron una forma cristalina muy estable de (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoato de sodio denominada Forma A para el uso en combinación con al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una forma polimórfica A de la sal sódica de ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico caracterizada por un espectro de XRD de polvo con picos en valores del ángulo  $2\theta \pm 0,2^\circ$  de 4,3, 5,0, 5,8, 6,4, 7,1, 8,3, 8,7, 12,8, 15,3, 15,9.

40 La invención se refiere además a la forma polimórfica A de la sal sódica del ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico para el uso como medicamento, preferiblemente para el uso en el tratamiento de tumores. Por tanto, la combinación farmacéutica comprende preferentemente la forma polimórfica A de la sal sódica de ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico y al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios. En otro aspecto, la invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende el antagonista de EP4 seleccionado de ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico o una sal farmacéuticamente aceptable y al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios para su uso como medicamento.

50 En otro aspecto, la invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende el antagonista de EP4 seleccionado de ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico o una sal farmacéuticamente aceptable y al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios para el uso en el tratamiento de tumores.

En otro aspecto, la invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende el antagonista de EP4 que consiste en la Forma A cristalina de (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoato de sodio y al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios para su uso en el tratamiento

de tumores. Por consiguiente, la invención se dirige además a un método para tratar un tumor, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la combinación farmacéutica de la invención.

Los inhibidores de puntos de control inmunitarios comprenden, entre otros, PD-1 (muerte programada-1), PD-L1 (muerte programada-ligando 1), CTLA-4 (antígeno de linfocitos T citotóxicos - 4), TIM3 (inmunoglobulina de células T y mucina-3), OX-40 y su ligando OX40L, LAG-3 (gen de activación de linfocitos-3), KIR (receptor similar a inmunoglobulina de células citotóxicas), VISTA (supresor de activación de células T que contiene Ig de dominio V), IDO1 (indolamina 2,3-dioxigenasa), TIGIT (inmunoglobulina de células T y dominio ITIM), BTLA (atenuador de linfocitos B y T), A2AR (receptor de adenosina A2), SIGLEC7 (lectina 7 de tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico), GTR (gen relacionado con la familia TNFR inducido por glucocorticoides), ICOS (coestimulador de células T inducible), NOX-2 (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato NADPH oxidasa, isoforma 2), Arginasa I, CD276 (grupo de diferenciación 276, también conocido como B7H4), CD27 (cúmulo de diferenciación 27) y su ligando CD27 (cúmulo de diferenciación 27), CD160 (cúmulo de diferenciación 160) y CD39 (cúmulo de diferenciación 39).

Preferiblemente, los inhibidores de puntos de control inmunitarios son anticuerpos neutralizantes anti PD-1 (p. ej., Nivolumab (Opdivo), Pembrolizumab (Keytruda)), anti CTLA-4 (p. ej., ipilimumab, tremelimumab), anticuerpos anti TIM-3 (p. ej., MBG453) o anticuerpos anti LAG-3.

El anticuerpo, por ejemplo, el anti PD-1 utilizado en la presente invención o el anticuerpo contra cualquiera de los otros puntos de control inmunitarios enumerados anteriormente, antes de la administración se mezclará generalmente en una sustancia farmacéuticamente aceptable, como una solución salina fisiológica, y puede administrarse utilizando cualquier método apropiado, incluidos, entre otros, inyección intravenosa, intradérmica, intraperitoneal o intratecal.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a las cantidades del antagonista de EP4 y del al menos un inhibidor de puntos de control que corresponderán a cantidades que variarán dependiendo de factores tales como el inhibidor de puntos de control particulares (por ejemplo, la potencia (CI<sub>50</sub>), eficacia (CE<sub>50</sub>), y la vida media biológica del inhibidor de puntos de control particulares), el estado del tumor y su gravedad, la identidad (p. ej., edad, tamaño y peso) del paciente que necesita tratamiento, pero, no obstante, puede ser determinada de forma rutinaria por un experto en la técnica. Asimismo, la duración del tratamiento y el período de tiempo de administración (período de tiempo entre las dosis y el momento de las dosis, por ejemplo, antes/con/después de las comidas) de los compuestos contenidos en la combinación variará según la identidad del ser humano en cuestión que necesita el tratamiento (p. ej., el peso), el compuesto particular y sus propiedades (p. ej., características farmacéuticas), el tumor y su gravedad, que no obstante puede ser determinado por un experto en la técnica.

El antagonista de EP4 de la invención y el al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios de la invención pueden administrarse, independientemente uno del otro, mediante cualquier vía de administración adecuada, incluida la administración sistémica y la administración tópica.

La administración sistémica incluye la administración oral, administración parenteral, administración transdérmica, administración rectal y administración por inhalación.

La combinación del antagonista de EP4 de la invención y el al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios de la invención puede administrarse una vez o según un régimen de dosificación en el que se administran varias dosis a intervalos de tiempo variables durante un período de tiempo determinado. Las dosis pueden administrarse hasta que se logre el efecto terapéutico deseado o indefinidamente para mantener el efecto terapéutico deseado. Los regímenes de dosificación adecuados para el antagonista de EP4 de la invención y el al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios de la invención dependen de las propiedades farmacocinéticas de dichos compuestos, como la absorción, distribución y semivida, que puede determinar el experto en la técnica. La combinación de la invención también se puede formular en una composición farmacéutica antes de la administración a un paciente. Las composiciones farmacéuticas de la invención se preparan utilizando técnicas y métodos conocidos por los expertos en la técnica.

En un aspecto más preferido, los tumores pueden incluir, entre otros, cánceres colorrectales, cánceres de vejiga, cánceres suprarrenales, cánceres de mama, cánceres cerebrales, gliomas, glioblastomas, cánceres de cuello uterino, cánceres de cabeza y cuello, cánceres de endometrio, cánceres de pulmón, cánceres de ovario, melanoma, cánceres de próstata, cánceres de riñón, cánceres renales, cánceres de hígado, cánceres de tiroides, cánceres de páncreas, sarcoma, fibrosarcoma. En un aspecto aún más preferido, los inhibidores de puntos de control inmunitarios son inhibidores de puntos de control anti CTLA-4 y/o anti PD-1/PD-L1.

Para todos los métodos de tratamiento, en algunas realizaciones, la dosis eficaz de anticuerpo anti-PD-1 utilizada es de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg de peso corporal total, con dosis preferibles de 2 mg/kg o 3 mg/kg.

Un experto en la técnica también reconocerá que la cantidad y el espaciamiento óptimos de las dosis individuales estarán determinados por la naturaleza y el alcance de la afección que se está tratando.

La invención se detallará adicionalmente a continuación con referencia a la parte experimental.

**Parte experimental**

Los reactivos usados en los siguientes ejemplos estaban disponibles comercialmente de varios proveedores y se usaron sin purificaciones adicionales. Los disolventes se utilizaron en forma seca. Las reacciones en ambiente anhidro se realizaron bajo una presión positiva de N<sub>2</sub> seco. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones (<sup>1</sup>H RMN) se registraron en un instrumento Bruker Avance de 400 MHz. Los desplazamientos químicos se informan en ppm (δ) usando la línea de disolvente residual como estándar interno. Los patrones de división se designan como: s, singlete; d, doblete; t, triplete; q, cuarteto; m, multiplete; b, señal ancha.

Los espectros de masas (MS) se realizaron en un espectrómetro clásico Ion Trap Thermo LCQ, funcionando en modo de ionización ES (+) positivo y ES (-) negativo.

Los espectros de UPLC se realizaron en un instrumento Waters Acquity UPLC-SQD utilizando una columna Acquity UPLC-BEH C18 (1,7 μm, 50 x 2,1 mm).

La cromatografía ultrarrápida en gel de sílice se realizó en sistemas automáticos de cromatografía ultrarrápida Biotage (sistemas Isolera) usando cartuchos de sílice Biotage SNAP HP. La cromatografía de fase inversa se realizó en sistemas automáticos de cromatografía ultrarrápida Biotage (sistemas Isolera) utilizando cartuchos RediSep Gold C-18Aq. Las purificaciones de algunos compuestos básicos se realizaron utilizando cartuchos Phenomenex Strata SCX (55 μm, 70 Å).

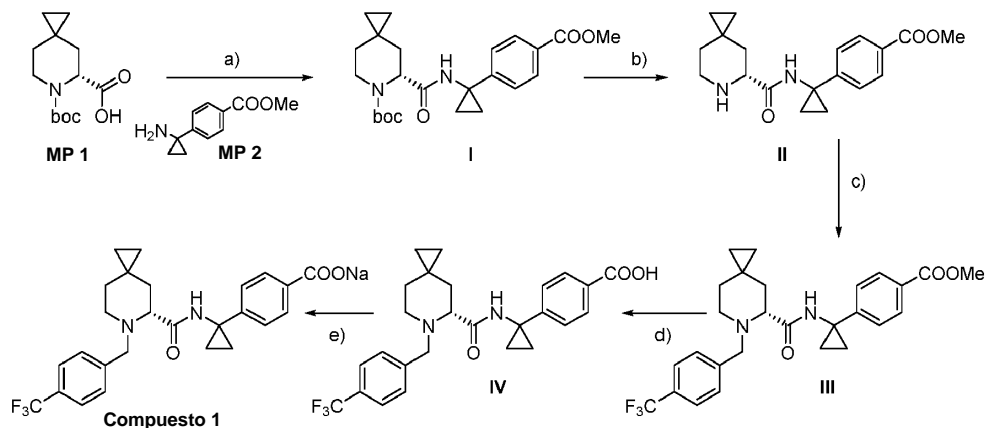
La cromatografía en capa fina se llevó a cabo usando placas de TLC de Merck Kieselgel 60F-254, visualizadas con luz UV, disolución acuosa de permanganato, vapores de yodo.

En la presente memoria se utilizan las siguientes abreviaturas: AcOH: ácido acético; DIAD: (E)-diazeno-1,2-dicarboxilato de diisopropilo; Boc: terc-butiloxycarbonilo; DCM: diclorometano; TFA: ácido trifluoroacético; DMF: dimetilformamida; THF: tetrahidrofurano; TA: temperatura ambiente; AcOEt: acetato de etilo; NaOH: hidróxido de sodio; LiOH: hidróxido de litio; DIPEA: N,N-diisopropiletilamina; TEA: trietilamina; NaHCO<sub>3</sub>: bicarbonato de sodio; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: sulfato de sodio; Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: carbonato de cesio; NaHMDS: bis(trimetilsilil)amida de sodio; HOBt: 1-hidroxibenzotriazol

Ejemplo 1:

Preparación del antagonista de EP4 de fórmula ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico, sal sódica

El compuesto se obtuvo siguiendo los pasos de síntesis como en el siguiente esquema 1:



a) Conversión del material de partida (MP1) en el compuesto de fórmula (I), usando el material de partida (MP2) y un agente de acoplamiento adecuado;

b) Desprotección del compuesto (I) en medio ácido como TFA en DCM para obtener el compuesto (II);

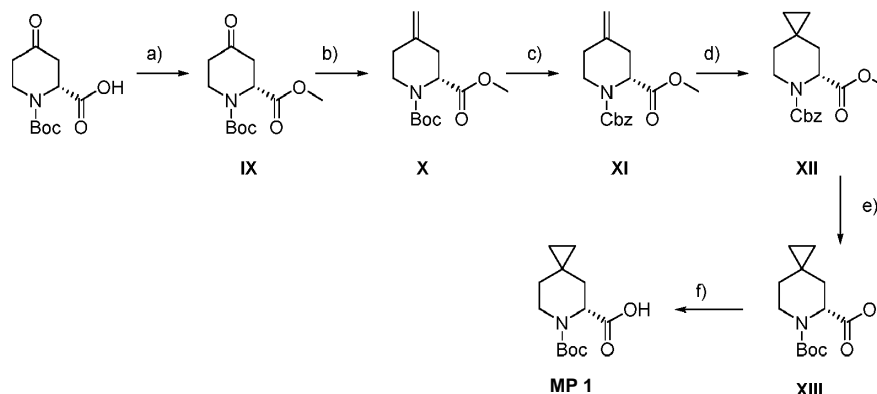
c) Alquilación del nitrógeno del anillo con bromuro de bencilo en presencia de una base adecuada para obtener el compuesto (III);

d) Hidrólisis del éster metílico utilizando una base inorgánica adecuada como NaOH para obtener el compuesto (IV); y

e) Formación y cristalización de la sal de sodio en un disolvente adecuado.

## Ejemplo 1a) Síntesis del material de partida 1 (MP 1)

El material de partida MP1 informado en el esquema 1 anterior se obtuvo mediante los siguientes pasos informados en el esquema 2 a continuación:



- 5 a) Conversión de ácido (R)-1-(terc-butoxicarbonil)-4-oxopiperidin-2-carboxílico (preparado según Tetrahedron (1997) 15671-15680) en éster metílico (IX), utilizando MeI y una base adecuada como Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- b) Reacción de Wittig utilizando bromuro de metiltrifenilfosfonio en tolueno para obtener el compuesto (X)
- c) Desprotección del nitrógeno de la piperidina usando un reactivo ácido adecuado como HCl en MeOH y posterior protección usando cloruro de Cbz en DCM para obtener el compuesto (XI)
- 10 d) Formación de ciclopropano utilizando un reactivo organometálico como dietilzinc en THF, diyodometano y TFA para obtener el compuesto (XII)
- e) Desprotección del nitrógeno de la piperidina utilizando un agente reductor como hidrógeno y paladio sobre carbón vegetal en MeOH y posterior protección mediante (BOC)<sub>2</sub>O para obtener el compuesto (XIII)
- 15 f) Hidrólisis del éster metílico utilizando una base inorgánica adecuada como LiOH en THF/MeOH para obtener (MP 1)

## - Síntesis del intermedio (IX) (R)-4-oxopiperidin-1,2 dicarboxilato de 1-(terc-butil) 2-metilo

Con referencia al esquema 2, se preparó el intermedio (IX).

En un matraz de fondo redondo, se disolvió ácido (R)-1-(terc-butoxicarbonil)-4-oxopiperidin-2-carboxílico (10 g; 0,041 mol) en DMF (25 ml) y se enfrió a 3 °C. Se añadió carbonato de cesio (0,6 eq.), luego se añadió gota a gota yoduro de metilo (1,1 eq): después de 2 h a TA, la mezcla se diluyó con agua (250 ml) y se extrajo con AcOEt (3x150 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (150 ml x 3), seguido de salmuera (150 ml), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y concentraron a 40 °C para obtener el compuesto del título (9 g; 85 %) como un sólido marrón claro.

1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  = 5,28 - 4,75 (m, 1H), 4,13 - 4,03 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,72 - 3,55 (m, 1H), 2,92 - 2,70 (m, 2H), 2,53 (s ancho, 2H), 1,50 (s ancho, 9H) ESI + m/z 258 [M+H]<sup>+</sup>

## 25 - Síntesis del intermedio (X) (R)-4-metilenpiperidin-1,2-dicarboxilato de 1-(terc-butil) 2-metilo

Con referencia al esquema 2, se preparó el intermedio (X).

Se disolvió bromuro de metiltrifenilfosfonio (1,1 equiv.) en tolueno seco (400 ml), se enfrió a 3 °C y luego se vertió lentamente una disolución de NaHMDS (1,05 equiv.). Después de 1 hora bajo atmósfera de nitrógeno a 3 °C, se añadió el intermedio (IX) (9 g, 0,035 mol) en tolueno seco (200 ml) y se agitó durante 1 hora. Una vez completada, la reacción se inactivó con hielo/agua (800 ml), las dos capas se separaron, la capa orgánica se lavó con agua (350 ml) seguido de salmuera (350 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt de 95-5 a 60-40 para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (8 g; 90 %).

1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  = 5,12 - 4,76 (m, 3H), 4,27 - 3,97 (m, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,23 - 2,92 (m, 1H), 2,86 - 2,69 (m, 1H), 2,57 - 2,38 (m, 1H), 2,21 (s ancho, 2H), 1,49 (s ancho, 9H). ESI + m/z 256 [M+H]<sup>+</sup>

## - Síntesis del intermedio (XI) (R)-4-metilenpiperidin-1,2-dicarboxilato de 1-bencil 2-metilo

Con referencia al esquema 2, se preparó el intermedio (XI).

## ES 2 939 490 T3

El intermedio (X) (8 g; 0,031 mol) se disolvió en metanol seco (150 ml), se enfrió a 0 °C y luego se añadieron lentamente 300 ml de una disolución metanólica de HCl 3 M. Después de 2 horas a TA, el disolvente se evaporó hasta sequedad, el residuo se disolvió en DCM (250 ml), se enfrió a 0 °C, luego se agregaron trietilamina (2,5 eq) y cloroforniato de bencilo (1,2 eq) después de 1 hora a TA. Una vez completada, la reacción se inactivó con agua helada; las dos capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua seguido de una disolución de salmuera (250 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró por debajo de 40 °C para obtener un residuo que se purificó por cromatografía en columna usando gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt 95-5 a 60-40 para producir el compuesto del título como un sólido blanco (6,7 g; 74%).

1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  = 7,45 - 7,30 (m, 5H), 5,24 - 4,93 (m, 3H), 4,83 (s, 2H), 4,31 - 4,13 (m, 1H), 3,84 - 3,62 (m, 3H), 3,26 - 3,03 (m, 1H), 2,86 - 2,74 (m, 1H), 2,55 - 2,43 (m, 1H), 2,34 - 2,17 (m, 2H). ESI + m/z 290 [M+H]<sup>+</sup>

- Síntesis del intermedio (XII) (R)-6-azaspiro[2.5]octano-5,6-dicarboxilato de 6-bencil 5-metilo

Con referencia al esquema 2, se preparó el intermedio (XII).

Se enfrió DCM (150 ml) a 0 °C, luego se añadió lentamente una disolución de dietil zinc en THF (2,3 eq) y se agitó durante 30 minutos. Se añadió lentamente ácido trifluoroacético (2,0 eq) a 0 °C y se agitó durante 60 minutos, luego se añadió diyodometano (4,0 eq) y se agitó durante 60 minutos a 0 °C. Se añadió lentamente el intermedio (XI) (6 g; 0,02 mol) en diclorometano seco (50 ml) a 0 °C, luego se dejó en agitación a 25 °C durante 20 horas. La masa de reacción se inactivó con una disolución de bicarbonato de sodio al 10 % (400 ml). El precipitado sólido se filtró, las capas se separaron del filtrado y la capa orgánica se lavó con agua (250 ml x 2) seguido de disolución de salmuera (250 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró por debajo de 40 °C, obteniendo un residuo que se purificó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt 95-5 a 60-40 para producir el compuesto del título como un sólido blanco (4,72 g; 75%).

1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  ppm 0,03 - 0,47 (m, 78 H) 0,76 - 0,92 (m, 1 H) 1,26 - 1,48 (m, 1 H) 1,49 - 1,70 (m, 2 H) 1,75 (s, 1 H) 1,88 - 2,04 (m, 1 H) 2,19 (s, 1 H) 2,35 - 2,41 (m, 1 H) 3,17 - 3,39 (m, 1 H) 3,61 - 3,83 (m, 3 H) 4,14 (m, J=11,74 Hz, 1 H) 4,96 (m, j=4,89 Hz, 1 H) 5,12 - 5,25 (m, 2 H) 7,15 - 7,28 (m, 1 H) 7,37 (m, j=9,29 Hz, 5 H). ESI + m/z 304 [M+H]<sup>+</sup>

- Síntesis del intermedio (XIII) (R)-6-azaspiro[2.5]octano-5,6-dicarboxilato de 6-(terc-butil) 5-metilo

Con referencia al esquema 2, se preparó el intermedio (XIII).

Se disolvió el intermedio (XII) (4,5 g, 0,015 mol) en metanol (200 ml), se añadió Pd/C al 10 % (400 mg), luego la suspensión se hidrogenó a 3 bares durante 2 horas. Una vez completada, la reacción se filtró a través de un lecho de celite, lavando con metanol (200 ml). La disolución se concentró a 150 ml, se enfrió a 20 °C, luego se añadió anhídrido Boc lentamente (1,2 eq) y se agitó durante 16 horas a 25 °C. Una vez completada la reacción, se evaporó el disolvente y luego se purificó el residuo por cromatografía en columna utilizando gel de sílice eluyendo con hexano/AcOEt 95-5 a 60-40 para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (3,68 g; 92%).

1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  = 5,03 - 4,71 (m, 1H), 4,21 - 3,90 (m, 1H), 3,74 (s, 3H), 3,35 - 3,04 (m, 1H), 2,27 - 2,13 (m, 1H), 2,02 - 1,83 (m, J=4,6, 13,1, 13,1 Hz, 1H), 1,56 - 1,38 (m, 10H), 0,95 - 0,72 (m, 1H), 0,43 - 0,20 (m, 4H).

ESI + m/z 270 [M+H]<sup>+</sup>

- Síntesis del material de partida 1 (MP 1) ácido (R)-6-(terc-butoxicarbonil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxílico

Con referencia al esquema 2 se obtuvo el material de partida (MP1).

Se disolvió el intermedio (XIII) (3,5 g; 0,013 mol) en THF (100 ml) y metanol (100 ml), se enfrió a 0 °C y luego se añadió gota a gota una disolución de hidróxido de litio (3,0 eq en 50 ml de agua).

La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas. La reacción se enfrió a 10 °C, se inactivó con ácido acético a pH 5 (50 ml), se concentró separando el MeOH y THF por destilación. La masa concentrada se diluyó con hielo - agua y se extrajo con acetato de etilo (300 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (200 ml) seguido de salmuera (200 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró por debajo de 50 °C. Al residuo se le añadió éter de petróleo (300 ml); el sólido se filtró y se secó al vacío durante 24 horas a 40 °C. Rendimiento de 3 g (92%)

1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  = 5,11 - 4,77 (m, 1H), 4,18 - 3,88 (m, 1H), 3,32 - 3,09 (m, 1H), 2,32 - 2,14 (m, 1H), 2,03 - 1,88 (m, 1H), 1,67 - 1,55 (m, 1H), 1,50 (s ancho, 9H), 0,97 - 0,75 (m, 1H), 0,52 - 0,26 (m, 4H). ESI + m/z 256 [M+H]<sup>+</sup>

Ejemplo 1b) Síntesis del material de partida 2 (MP 2)

El material de partida 2 (MP 2) se preparó de acuerdo con procedimientos conocidos en la bibliografía (documento WO2008104055, ejemplo 1, paso 2).

*Ejemplo 1c) síntesis del intermedio (I) (R)-S-((1-(4-(metoxicarbonil)fenil)ciclopropil)carbamoil)-6-azaespiro[2.5]octano-6-carboxilato de terc-butilo*

Con referencia al esquema 1, se obtuvo el intermedio (I).

5 Se disolvieron 10 g (0,039 mmol) del material de partida 1 en DCM (200 ml), se añadieron hidrato de HOBt (1,1 eq) y EDC-HCl (1,1 eq) y la mezcla se agitó a 20 °C durante 30 minutos. Se añadió el material de partida 2 (1,02 eq.), luego TEA (1,2 eq.); la reacción se dejó en agitación durante 6 horas a 30 °C, luego se inactivó con agua (100 ml). La fase orgánica se lavó con una disolución de bicarbonato de sodio al 5% (100 ml), disolución de ácido cítrico 1 M (200 ml), agua (200 ml). Se evaporó el DCM, se añadió t-butilmetil éter (200 ml) y luego se evaporó de nuevo el disolvente. Se añadieron 400 ml de t-butilmetil éter, la suspensión se agitó a 20 °C durante 17 horas, luego el sólido blanco se filtró  
10 y se lavó con t-butilmetil éter frío. El producto se secó al vacío a 50 °C. Rendimiento de 14,7 g (88 %)

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,01 - 7,93 (m, 2H), 7,28 (s, 2H), 6,74 (s, 1H), 4,83 (s ancho, 1H), 4,21 (s ancho, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,10 - 2,87 (m, 1H), 2,10 - 1,99 (m, 1H), 1,97 - 1,85 (m, 1H), 1,84 - 1,75 (m, 1H), 1,52 (s, 9H), 1,40 (s ancho, 4H), 0,88 - 0,81 (m, 1H), 0,63 - 0,45 (m, 1H), 0,45 - 0,29 (m, 2H), 0,28 - 0,18 (m, 1H).

ESI + m/z 429 [M+H]<sup>+</sup>

*Ejemplo 1d): síntesis del intermedio (II) (R)-4-(1-(6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoato de metilo*

Con referencia al esquema 1, se obtuvo el intermedio (II).

20 Se disolvió el intermedio (I) (14 g; 0,032 mmol) en DCM (150 ml), se añadió TFA (10 eq.) y la disolución se agitó a 20 °C durante 5 horas. La mezcla de reacción se destiló al vacío, se añadió DCM (100 ml), se añadió lentamente disolución saturada de bicarbonato de sodio a 15 - 25 °C (300 ml, formación significativa de espuma). La fase orgánica se lavó con agua (200 ml) y se evaporó a presión reducida. Se añadió t-butilmetil éter (200 ml) y luego el disolvente se evaporó de nuevo. Se añadieron 300 ml de t-butilmetil éter, la suspensión se agitó a 20 °C durante 17 horas, luego el sólido blanco se filtró y se lavó con t-butilmetil éter frío. El producto se secó al vacío a 50 °C. Rendimiento de 9,65 g (90 %)

25 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 7,96 (d, J=8,3 Hz, 2H), 7,61 (s ancho, 1H), 7,26 (d, J=8,3 Hz, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,46 - 3,39 (m, 1H), 3,13 - 3,04 (m, 1H), 2,92 - 2,82 (m, 1H), 1,87 - 1,70 (m, 3H), 1,41 - 1,28 (m, 5H), 1,01 - 0,93 (m, 1H), 0,46 - 0,24 (m, 4H).

ESI + m/z 329 [M+H]<sup>+</sup>

*Ejemplo 1e) síntesis del intermedio (III) (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometilbencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoato de metilo*

Con referencia al esquema 1, se obtuvo el intermedio (III).

30 Se disolvió el intermedio (II) (9,5 g, 0,029 mmol) en THF seco (150 ml), y luego se añadieron Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 eq) y bromuro de 4-(trifluorometil)bencilo (1,2 eq disueltos en 75 ml de THF). La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 8 horas, luego se añadieron 350 ml de DCM y 350 ml de agua. La fase orgánica se lavó con agua (150 ml) y salmuera (250 ml) y se evaporó a presión reducida. Se añadió n-heptano (1500 ml) y luego el disolvente se evaporó de nuevo. Se añadieron 150 ml de n-heptano, la suspensión se agitó a 20 °C durante 4 horas, luego el sólido blanco se filtró y se lavó con n-heptano. El producto se secó al vacío a 50 °C. Rendimiento de 12,95 g (92 %).

35 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 7,96 - 7,89 (m, 2H), 7,66 - 7,61 (m, 2H), 7,47 - 7,40 (m, 3H), 7,27 - 7,21 (m, J=8,8 Hz, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,84 (d, J=14,7 Hz, 1H), 3,35 (d, J=14,7 Hz, 1H), 3,05 (dd, J=3,9, 10,3 Hz, 1H), 2,93 - 2,86 (m, 1H), 2,31 - 2,22 (m, 1H), 2,07 - 1,98 (m, 1H), 1,88 - 1,78 (m, 1H), 1,45 - 1,27 (m, 4H), 1,17 - 1,08 (m, 1H), 1,01 - 0,94 (m, 1H), 0,50 - 0,36 (m, 3H), 0,33 - 0,26 (m, 1H).

40 ESI + m/z 487 [M+H]<sup>+</sup>

*Ejemplo 1f): síntesis del intermedio (IV) ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico*

Con referencia al esquema 1, se obtuvo el intermedio (IV), el antagonista de EP4 en forma de ácido.

45 Se disolvió el intermedio (III) (12 g, 0,024 mmol) en THF (70 ml), luego se añadió NaOH 2 N (4 eq). La reacción se dejó agitando a 5 °C durante 5 horas, luego se añadió agua (200 ml) y los componentes orgánicos se evaporaron. Se añadieron 200 ml de diclorometano y el pH de la mezcla se ajustó a 4,5-5,0 con ácido acético; la fase orgánica se lavó con agua y salmuera (200 ml x 3), se evaporó para obtener el compuesto del título (9,9 g; 85 %)

50 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 12,72 (1 H, s), 8,73 (1 H, s), 7,78 (2 H, d, J=8,6 Hz), 7,69 (2 H, d, J=8,3 Hz), 7,64 (2 H, d, J=8,3 Hz), 7,20 (2 H, d, J=8,6 Hz), 3,79 (2 H, d, J=13,9 Hz), 3,28 (1 H, d, J=13,9 Hz), 2,93 (1 H, dd, J=3,1; 10,3 Hz), 2,73 (1 H, m), 2,08 (2 H, m), 1,78 (1 H, m), 1,10-1,31 (5 H, m), 0,87 (1 H, m), 0,32 (4H,m).

ESI + m/z 473 [M+H]<sup>+</sup>.

El antagonista de EP4 así obtenido se analizó y se descubrió que era un ión dipolar en forma de un sólido amorfo.

*Ejemplo 1g) preparación de la sal sódica del ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico*

- 5 Las únicas formas cristalinas que se pudieron obtener del ión dipolar del Ejemplo 1f) fueron los solvatos, que dieron lugar fácilmente a la forma amorfa por estrés térmico (p. ej., calentamiento para reducir el contenido de disolvente al nivel ICH) o mecánico.

Por tanto, se preparó una sal de clorhidrato añadiendo al intermedio (IV) HCl en éter etílico.

- 10 Se investigó el clorhidrato del intermedio (IV) y se identificaron a partir del cribado una forma amorfa y dos formas cristalinas (anhidra A y solvato B).

La forma anhidra A se investigó adicionalmente. La forma A del clorhidrato intermedio (IV) mostró tendencia a convertirse en la forma amorfa bajo estrés mecánico o térmico. La estabilidad química era comparable a la del ión dipolar amorfo del ejemplo 1f).

- 15 Se preparó una sal de sodio añadiendo NaOH en EtOH después de la solubilización del intermedio (IV) en un disolvente. Se probaron diferentes disolventes (n-propanol, n-butanol, iPrOH), pero se seleccionó el n-propanol por su mayor rendimiento y fácil secado. Se obtuvieron dos formas cristalinas que se denominaron formas A y D: la forma A se obtuvo directamente de la cristalización de n-propanol, la forma D se obtuvo solo por hidratación de la forma A. Durante las pruebas de estabilidad física, se encontró que la forma D era propensa a la conversión a la forma amorfa por estrés mecánico (molienda) y durante el secado.

- 20 Por el contrario, se encontró que la forma A de la sal de sodio era más estable frente a la amorfización por estrés térmico, aunque se observó la amorfización por estrés mecánico a alta energía. La forma A era la forma anhidra termodinámicamente más estable, la forma D era la forma hidratada más estable. Otras formas eran menos estables o metaestables. Estas formas, así como la forma amorfa, se convirtieron fácilmente en la forma estable A mediante una suspensión sólida de acetona, éter dietílico, acetato de isopropilo, THF, heptano.

- 25 Se estableció el protocolo de síntesis de (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoato de sodio (Forma A) (denominado también Compuesto 1) como se informa a continuación.

- 30 Se disolvió el intermedio (IV) (50 g, 0,1 mol) en n-propanol (400 ml), luego se añadió una disolución enfriada de NaOH (1,02 eq) en EtOH (70 ml). La suspensión se agitó a 20-24 °C durante 18-20 horas, luego se filtró, se lavó con n-propanol enfriado previamente (100 ml) y se secó a 70 °C durante 24 horas. Rendimiento de 43 g, sólido blanco (87%).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 8,68 (1 H, s), 7,73 (2 H, d, J=8,3 Hz), 7,69 (2 H, d, J=8,3 Hz), 7,64 (2 H, d, J=8,3 Hz), 7,02 (2 H, d, J=8,3 Hz), 3,81 (2 H, d, J=13,9 Hz), 3,26 (1 H, d, J=13,9 Hz), 2,92 (1 H, d, J=3,1; 10,5 Hz), 2,72 (1 H, m), 2,07 (2 H, m), 1,78 (1 H, m), 1,16 (4H, m), 1,09 (1H, m), 0,85 (1H, m), 0,30 (4H, m).

ESI + m/z 473 [M+H]<sup>+</sup>

- 35 Se realizaron estudios de solubilidad, disolución y biodisponibilidad tanto con el ión dipolar del ejemplo 1 f), las formas de sal y todas las formas de sodio. Las sales (especialmente ambas formas de la sal de sodio) mostraron propiedades de disolución mejoradas en comparación con las amorfas. Los experimentos de FC tanto en ratas como en perros no mostraron diferencias significativas entre las diversas formas en términos de exposición y biodisponibilidad, pero la forma A de la sal de sodio parece ser la forma elegida para el desarrollo en vista de la estabilidad y las propiedades farmacéuticas de fabricación.

- 40 Caracterización del (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoato de sodio (Forma A) (denominada también Compuesto 1)

RMN de estado sólido

- 45 Las mediciones de RMN de estado sólido se realizaron en un instrumento Bruker AVANCE II 400 que funcionaba a 400,23 y 100,65 MHz para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, respectivamente. Los espectros de <sup>13</sup>C CPMAS se registraron a temperatura ambiente a una velocidad de giro de 12 kHz. Se emplearon rotores de zirconio cilíndricos de 4 mm de diámetro exterior con un volumen de muestra de 80 µL. Para los experimentos de CPMAS, se utilizó una secuencia de pulsos de polarización cruzada en rampa con un tiempo de contacto de 3 ms, un pulso de 90° <sup>1</sup>H de 4,0 µs, retrasos de reciclaje de 5-10 s y 2000-4000 transitorios. Se utilizó el esquema de desacoplamiento de modulación de fase de dos pulsos
- 50 con un campo de frecuencia de 75 KHz

## ES 2 939 490 T3

Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  (ppm)

$\delta = 177,1; 144,8; 143,1; 136,9; 129,3; 124,9; 71,4; 65,5; 61,3; 57,3; 51,2; 39,0; 35,1; 23,2; 18,0; 14,9; 12,6.$

XRPD

5 Las mediciones de XRPD se realizaron en un difractómetro de rayos X de polvo PANalytical X'pert Pro con geometría *Bragg-Brentano* y equipado con:

- a) Detector X'Celerator
- b) Multimuestreador
- c) Soporte giratorio
- d) Tubo de rayos X cerámico Cu LFF ( $\lambda_1=1,54051 \text{ \AA}$ ;  $\lambda_2=1,54430 \text{ \AA}$ )

10 Rango 4 -  $40^\circ 2\theta$

Picos característicos ( $^\circ 2\theta$ )
4,3 $\pm 0,2^\circ 2\theta$
5,0 $\pm 0,2^\circ 2\theta$
5,8 $\pm 0,2^\circ 2\theta$
6,4 $\pm 0,2^\circ 2\theta$
7,1 $\pm 0,2^\circ 2\theta$
8,3 $\pm 0,2^\circ 2\theta$
8,7 $\pm 0,2^\circ 2\theta$
12,8 $\pm 0,2^\circ 2\theta$
15,3 $\pm 0,2^\circ 2\theta$
15,9 $\pm 0,2^\circ 2\theta$

DSC

El termograma se adquirió utilizando un Perkin-Elmer DSC8000, la velocidad de barrido fue de  $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  desde  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ . El termograma se muestra en la Figura 1.

15 Pico detectado: T inicio=  $252,64 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H= 56,11 \text{ J/g}$

IR

El espectro IR se registró en un instrumento Perkin Elmer Spectrum 100 FT/IR entre  $4000$  y  $650 \text{ cm}^{-1}$  mediante el modo ATR (reflectancia total atenuada). El espectro IR se informa en la Figura 2. Las principales frecuencias de absorción se informan en la siguiente tabla:

Banda ( $\text{cm}^{-1}$ )
3301
2996
2938-2821
1659
1590
1540
1411

20

Estabilidad de la forma A

Se investigó la estabilidad de la Forma A (denominada también Compuesto 1) de la sal sódica del ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)encil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico a diferentes valores de humedad y temperaturas. Los resultados se informan en la siguiente tabla:

	TA	50% HR - 30 °C	70% HR - 40 °C	90% HR - 30 °C	80 °C
Polvo	Estable > 1 mes	Estable > 24 horas	Estable hasta 4 horas	Estable hasta 4 horas	Estable > 5 días
Lámina sellada/bolsa de polietileno			Estable > 3 meses		

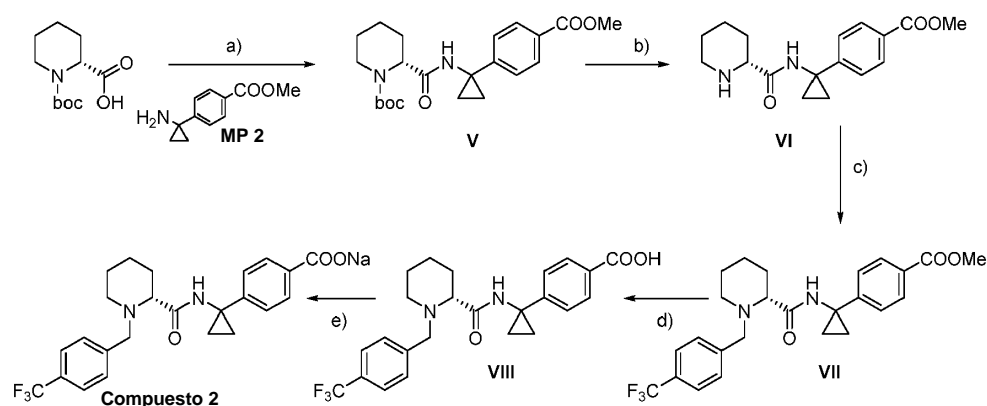
HR= humedad relativa

Ejemplo 2:

Preparación de la sal sódica del ácido (R)-4-(1-(1-(4-(trifluorometil)encil)piperidin-2-carboxamido)ciclopropil)benzoico (denominado también Compuesto 2)

- 5 El antagonista de EP4 del ejemplo 1 se comparó con otro antagonista de EP4 descrito en el documento WO2013/004290, es decir, ácido (R)-4-(1-(1-(4-(trifluorometil)encil)piperidin-2-carboxamido)ciclopropil)benzoico.

El compuesto se obtuvo siguiendo los pasos de síntesis como en el siguiente esquema 3:



- 10 a) Conversión de ácido (R)-1-(*tert*-butoxicarbonil)piperidin-2-carboxílico en el compuesto de fórmula (V), utilizando el material de partida (MP2) y un agente de acoplamiento adecuado;
- b) Desprotección del compuesto (V) en medio ácido como TFA en DCM para obtener el compuesto (VI);
- c) Alquilación del nitrógeno del anillo con bromuro deencilo en presencia de una base adecuada para obtener el compuesto (VII);
- 15 d) Hidrólisis del éster metílico utilizando una base inorgánica adecuada como LiOH para obtener el compuesto (VIII); y
- e) Formación de la sal de sodio utilizando NaOH en una mezcla de disolventes adecuada.

- *Ejemplo 2a: síntesis del intermedio (V) (R)-2-((1-(4-(metoxicarbonil)fenil)ciclopropil)carbamoil)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo*

- 20 Se disolvió ácido boc-D-pipecólico (500 mg, 2,181 mmol) en DCM (13 ml). Se añadieron hidrato de N-hidroxibenzotriazol (2,62 mmol) y EDCI (3,05 mmol) y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 40 min. Se añadió MP2 (2,268 mmol) seguido de TEA (2,94 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 15 h, luego se añadió agua (20 ml). Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (2 x 15 ml). Las capas orgánicas combinadas se evaporaron y se cargaron en una columna SNAP Ultra-HP Sphere-Si (10 g) eluyendo con ciclohexano/AcOEt 100 % hasta 70/30. Rendimiento de 810 mg (92 %), espuma de color amarillo claro.

- 25 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ = 8,00 - 7,93 (m, *j*=8,3 Hz, 2H), 7,27 - 7,22 (m, *j*=8,3 Hz, 2H), 6,76 (s ancho, 1H), 4,85 - 4,67 (m, 1H), 4,12 (s ancho, 1H), 3,92 (s, 3H), 2,97 - 2,66 (m, 1H), 2,29 (s ancho, 1H), 1,72 - 1,59 (m, 3H), 1,54 - 1,22 (m, 15H).

ESI + *m/z* 403 [M+H]<sup>+</sup>

- *Ejemplo 2b: síntesis del intermedio (VI) (R)-4-(1-(piperidin-2-carboxamido)ciclopropil)benzoato de metilo*

- 30 Siguiendo el esquema 3 se obtuvo el intermedio (VI).

Se disolvió el intermedio (V) (800 mg, 1,988 mmol) en DCM (8 ml). Se añadió TFA (19,88 mmol) y la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Los disolventes se evaporaron y el residuo se

cargó en cartuchos SPE-SCX (5 g) eluyendo con MeOH y NH<sub>3</sub> 1 M en MeOH. Las fracciones de amoníaco se evaporaron para obtener el compuesto del título (590 mg; 98 %)

5 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  = 8,00 - 7,92 (m, J=8,8 Hz, 2H), 7,58 (s ancho, 1H), 7,28 - 7,24 (m, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,33 - 3,27 (m, 1H), 3,10 - 3,03 (m, 1H), 2,80 - 2,69 (m, 1H), 2,20 (s ancho, 1H), 2,06 - 1,97 (m, 1H), 1,84 - 1,74 (m, 1H), 1,65 - 1,58 (m, 1H), 1,54 - 1,31 (m, 7H). ESI + m/z 303 [M+H]<sup>+</sup>

- Ejemplo 2c): *síntesis del intermedio (VII) (R)-4-(1-(1-(4-(trifluorometil)bencil)piperidin-2-carboxamido)ciclopropil)benzoato de metilo*

10 Se disolvió el intermedio (VI) (585 mg, 1,9 mmol) en THF (12 ml). La mezcla se agitó hasta que se disolvió el material. Se añadió carbonato de cesio (3,87 mmol) seguido de bromuro de 4-(trifluorometil)bencilo (2,42 mmol) y la mezcla se agitó durante 24 h. El THF se evaporó y el residuo se recogió en una mezcla de sol. sat. de DCM/NaHCO<sub>3</sub> (50 ml). Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (2 x 15 ml). Las capas orgánicas combinadas se evaporaron y el residuo se cargó en una columna SNAP Ultra-HP Sphere-Si (10 g) eluyendo con ciclohexano/acetato de etilo al 100 % hasta 70/30. Rendimiento de 850 mg (95%)

15 1H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 8,71 (s, 1H), 7,84 - 7,78 (m, 2H), 7,72 - 7,66 (m, 2H), 7,63 - 7,58 (m, 2H), 7,26 - 7,20 (m, J=8,8 Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,73 (d, J=14,2 Hz, 1H), 3,25 (d, J=14,2 Hz, 1H), 2,87 - 2,80 (m, 1H), 2,79 - 2,70 (m, J=11,7 Hz, 1H), 2,01 - 1,93 (m, 1H), 1,86 - 1,78 (m, 1H), 1,70 (br d, J=10,3 Hz, 2H), 1,57 - 1,38 (m, 2H), 1,35 - 1,23 (m, 3H), 1,21 - 1,11 (m, 2H). ESI + m/z 461 [M+H]<sup>+</sup>

- Ejemplo 2d): *síntesis del intermedio (VIII) ácido (R)-4-(1-(1-(4-(trifluorometil)bencil)piperidin-2-carboxamido)ciclopropil)benzoico*

20 Se añadió hidróxido de litio monohidrato (3,32 mmol) a una disolución de intermedio (VIII) (850 mg, 1,846 mmol) en agua/dioxano. La mezcla de reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 5 h, luego se añadió 1 ml de AcOH, se evaporó el dioxano y el residuo se cargó en una columna SPE Biotage C18 de 10 g, eluyendo con agua (2 VC) y MeOH (3 VC). Rendimiento del 94 % (772 mg, sólido blanco)

25 1H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 12,72 (s ancho, 1H), 8,69 (s, 1H), 7,83 - 7,76 (m, 2H), 7,72 - 7,66 (m, 2H), 7,64 - 7,59 (m, 2H), 7,24 - 7,18 (m, 2H), 3,74 (d, J=14,2 Hz, 1H), 3,25 (d, J=14,2 Hz, 1H), 2,88 - 2,79 (m, 1H), 2,79 - 2,72 (m, 1H), 2,01 - 1,93 (m, 1H), 1,88 - 1,77 (m, 1H), 1,76 - 1,63 (m, 2H), 1,57 - 1,38 (m, 2H), 1,37 - 1,21 (m, 3H), 1,21 - 1,09 (m, 2H). ESI + m/z 447 [M+H]<sup>+</sup>

- Ejemplo 2e): *síntesis del ácido (R)-4-(1-(1-(4-(trifluorometil)bencil)piperidin-2-carboxamido)ciclopropil)benzoico, sal sódica*

30 Se disolvió el intermedio (VII) (40 g, 89,7 mmol) en agua/dioxano, luego se añadió NaOH (98 mmol). Después de agitar durante 1 hora, se evaporó el THF. El residuo se cargó en una columna SPE Biotage C18 de 150 g (8 inyecciones), eluyendo con agua (4 VC) a MeOH (gradiente 4 CV). Las fracciones que contenían el producto deseado se evaporaron y el sólido obtenido se secó al vacío a 60 °C durante 3 días. Rendimiento del 98% (41 g, sólido blanco).

35 1H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 8,60 (s, 1H), 7,75 - 7,65 (m, J=7,8, 7,8 Hz, 4H), 7,65 - 7,57 (m, 2H), 7,05 - 6,96 (m, 2H), 3,75 (d, J=14,2 Hz, 1H), 3,24 (d, J=13,7 Hz, 1H), 2,84 - 2,78 (m, 1H), 2,78 - 2,71 (m, J=11,7 Hz, 1H), 2,01 - 1,91 (m, 1H), 1,86 - 1,76 (m, 1H), 1,74 - 1,63 (m, 2H), 1,56 - 1,36 (m, 2H), 1,34 - 1,20 (m, 1H), 1,19 - 1,00 (m, 4H). ESI + m/z 447 [M+H]<sup>+</sup>

Ejemplo 3:

40 *Efecto de la terapia de combinación del Compuesto 1 (Forma A de la sal sódica de ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico) y el Compuesto 2 con un anticuerpo anti-pd-1 de ratón en un modelo singénico de cáncer colorrectal de ratón.*

## MATERIAL Y MÉTODOS

45 Se alojaron cinco ratones Balb/c macho de 4-6 semanas de edad por jaula en una habitación con temperatura y humedad controladas con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h. Durante todo el experimento los animales tuvieron libre acceso a comida y agua. Los ratones Balb/c se dividieron aleatoriamente en 6 grupos (n=15 en cada grupo): vehículo, Compuesto 1, Compuesto 2, anti PD-1, Compuesto 1 + anti PD-1, Compuesto 2 + anti PD-1.

50 Las células CT26 se adquirieron de ATCC y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; ThermoFisher Scientific) complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS; Sigma Aldrich) a 37 °C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se subcultivaron dos veces por semana hasta que se obtuvo el número de células necesarias para la inoculación.

El día del trasplante (día 0) se recolectaron las células en fase de crecimiento logarítmico, se diluyeron en PBS y se inocularon por vía subcutánea 10<sup>6</sup> células en 0,2 ml de PBS en la región abdominal lateral de cada ratón usando una jeringa 26G.

El día 7 después de la inoculación, los ratones se aleatorizaron en los 6 grupos de tratamiento, cada uno de 15 animales que recibieron respectivamente el vehículo, el Compuesto 1, el Compuesto 2, anti PD-1 y las terapias de combinación.

5 El compuesto 1 y el compuesto 2 se administraron repetidamente por vía oral desde el día 7 hasta el día 23, 30 mg/kg una vez al día, mientras que el anticuerpo anti-PD-1 de ratón se administró por vía intraperitoneal a los ratones del grupo de terapia única con anticuerpo anti-PD-1 de ratón y a los ratones del grupo de terapia combinada a una dosis de 20 mg/kg el día 8 después del trasplante y a una dosis de 10 mg/kg el día 13, el día 19 y el día 22 después del trasplante.

10 Se evaluaron los tamaños tumorales ( $\text{mm}^3$ ) dos veces por semana utilizando un calibre digital. Los volúmenes de los tumores se calcularon midiendo las longitudes de los tumores a lo largo del eje mayor y menor y utilizando la fórmula:  $\text{Volumen} = [(\text{Longitud})^2 \times \text{Ancho}]/2$ .

## RESULTADOS

15 Para investigar el efecto de la terapia de combinación con el Compuesto 1 y el compuesto del ejemplo 2 y un anticuerpo anti-PD-1 de ratón, se usó un modelo de aloinjerto de una línea celular de cáncer colorrectal de ratón. Los tumores de células cancerosas CT26 que crecieron subcutáneamente en los ratones se trataron con los compuestos de los ejemplos 1 o 2 como terapia única o con los compuestos de los ejemplos 1 o 2 en una terapia combinada con un anticuerpo anti-PD-1 de ratón durante un período de 3 semanas.

20 El gráfico de la Figura 3 informa los volúmenes tumorales medidos semanalmente representados en los días posteriores a la inoculación de las células tumorales. Puede verse que la terapia única con el Compuesto 1 tuvo un efecto inhibitor leve sobre el crecimiento del cáncer a partir de la segunda semana de tratamiento, mientras que el compuesto del ejemplo 2 solo mostró un ligero deterioro del crecimiento del tumor. La terapia anti-PD-1 de ratón retrasó el crecimiento del cáncer, incluso si, según los datos informados en la bibliografía, la inhibición del crecimiento del cáncer fue solo parcial (Shindo, Y. *et al. Anticancer Res.* 35, 129-136 (2015)). Por el contrario, como se indica en la Figura 4, la eficacia antitumoral resultó significativamente mejorada por el tratamiento combinado con el Compuesto 1 y el anticuerpo anti-PD-1 de ratón.

25 Además, la evaluación del peso corporal de los animales a lo largo del tratamiento mostró que la terapia de combinación no afectó a la salud general de los animales (Figura 5).

## CONCLUSIONES

30 Los resultados informados anteriormente mostraron que el Compuesto 1 y el Compuesto 2 inhiben el crecimiento del tumor cuando se administran como una terapia única. Además, el Compuesto 1 mejora significativamente el efecto antitumoral del anticuerpo hacia PD-1 cuando se usa en combinación.

### Ejemplo 4

*Efecto de dos antagonistas de EP4 sobre la unión específica de 3H-PGE2 en subtipos de receptores de EP4 recombinantes humanos*

## 35 MÉTODO

Se prepararon membranas celulares a partir de la línea celular HEK293 (riñón embrionario humano 293) que sobreexpresa de forma estable el receptor EP4 humano recombinante. Las células crecen adherentes en DMEM con Glutamax I que contiene un 10 % de FBS a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Para la preparación de las membranas se aspiró el medio de cultivo de matraces de 150 cm<sup>2</sup> en los que se sembraron las células. Las monocapas celulares se lavaron con 10 ml de tampón de lisis hipotónico (TRIS 5 mM + EDTA 5 mM - pH 7,4), luego las células se separaron y se lisaron con el mismo tampón y mediante raspado mecánico. Los lisados se centrifugaron a 40000 x g a 4 °C durante 22 min. Los sedimentos se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

45 Los ensayos de unión de [3H]-prostaglandina E2 ([3H]-PGE2) se realizaron en tampón MES-KOH 10 mM, pH 6, que contenía MgCl<sub>2</sub> 10 mM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Se incuban diez microgramos de proteína de las fracciones de membrana en un volumen total de 0,1 ml con [3H]-PGE2 1 nM. Para determinar la unión total o la unión inespecífica, se añadieron DMSO al 1% o PGE2 1 μM a las mezclas de reacción, respectivamente. La unión específica representó > 85% de la unión total. En las curvas de competición, el diluyente se sustituyó por los compuestos de prueba (8 concentraciones que abarcan al menos 2 órdenes de magnitud; puntos por duplicado). En una serie independiente de experimentos, se realizaron curvas de competición de los mismos compuestos en presencia de albúmina de suero bovino al 0,5%.  
50 La incubación se llevó a cabo en una placa multipocillo de 96 durante 90 min a temperatura ambiente, antes de la separación del radioligando unido y libre mediante filtración rápida en filtros de fibra de vidrio (Unifilter GFB96, PerkinElmer Inc) previamente empapados en polietileno al 0,3 %. Los filtros se lavaron con tampón enfriado con hielo de pH 7,4 (HEPES 50 mM, NaCl 500 mM, BSA 0,1 %), se secaron durante 30 minutos a 30 °C y luego se añadieron 0,1 ml de MICROSCINT-20 (PerkinElmer Inc). La unión de [3H]-PGE2 residual se determinó mediante un  
55 contador de centelleo sólido (TopCount, PerkinElmer Inc), después de al menos 1 hora de estabilización. Los

resultados de las curvas de competición se expresaron como  $CI_{50}$ , y las  $K_i$  correspondientes se calcularon según la ecuación de Chang-Prousoff. Finalmente, el valor de  $K_i$  se transformó en  $pK_i$  (el logaritmo negativo de  $K_i$ ).

## RESULTADOS

- 5 Ambos compuestos en investigación mostraron una afinidad nanomolar por el receptor EP4 recombinante humano. Sin embargo, en presencia de proteínas (es decir, BSA), el Compuesto 2 mostró una afinidad 6 veces menor, como lo indica el valor más bajo de  $pK_i$  informado en la siguiente tabla con respecto al Compuesto 1 (7,5 y 6,7 en ausencia o presencia de BSA, respectivamente).

	pKi	
	Nada	BSA al 0,5%
Compuesto 1	7,9	7,6
Compuesto 2	7,5	6,7

- 10 Afinidad del Compuesto 1 y del Compuesto 2 ( $pK_i$ ) por el Receptor EP4 recombinante humano en ausencia o en presencia de BSA al 0,5%.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que el compuesto del ejemplo 2 tiene un mayor potencial de unión a proteínas (por ejemplo, BSA) *in vitro* en comparación con el compuesto 1, lo que influye en su interacción con el EP4R en estudio.

*Ejemplo 5:*

- 15 *Efecto in vitro del Compuesto 1 sobre la liberación de TNF $\alpha$  inducida por lipopolisacárido (LPS) y modulada por prostaglandina E2 (cultivo de sangre completa de rata)*

## MATERIAL Y MÉTODOS

- 20 Se alojaron seis ratas Wistar Han macho (250-300 g de peso corporal, Charles River, Italia) por jaula en una habitación con temperatura controlada, configurada para mantener la temperatura dentro del rango de  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y la humedad relativa dentro del rango de  $55\% \pm 10$  y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h. A lo largo del estudio, los animales tuvieron libre acceso a comida de laboratorio estándar (dieta de roedores Teklad 2018, Harlan Laboratories, S. Pietro al Natisone, UD, Italia) y agua potable. El cuidado y manejo de los animales estuvo de acuerdo con las directrices de las autoridades locales y las regulaciones de la Comunidad Europea. La autorización para los procedimientos experimentales fue otorgada por el Ministerio de Salud italiano. El día de los experimentos los animales fueron anestesiados con isoflurano al 2,5-3% en  $O_2$  dentro de una cámara de inducción y se extrajo sangre de la aorta abdominal. Las muestras de sangre completa se recogieron en tubos que contenían 0,1-0,2 U/ml de heparina. Se dispensaron alícuotas (0,5 ml) en una serie de tubos y, después de añadir 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de lipopolisacárido (serotipo de *E. coli* 055:B5; LPS; Sigma Aldrich) (muestras de control) o una mezcla de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de LPS + PGE2 0,1  $\mu\text{M}$  (Cayman Chemical), las muestras se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una incubadora con  $CO_2$  al 5% durante 4 horas. La concentración de estimulante seleccionada fue la concentración más baja de los ensayos de titulación anteriores, que da como resultado la activación celular; de lo contrario, es posible que se enmascaren alteraciones modestas en la producción de citoquinas. Asimismo, el tiempo de estimulación fue el óptimo, lo más breve posible, ya que la función de las células inmunitarias puede verse potencialmente afectada una vez que se extraen del animal. Después de 4 horas de estimulación, la liberación de citoquinas fue casi máxima, alcanzando una meseta después de 18-24 horas.

- 35 En las muestras que representaban la liberación basal de la citocina, se sustituyó el LPS por el mismo volumen de PBS estéril. Se prepararon LPS y PGE2 como una disolución madre en PBS+BSA estéril al 0,2 %. Al final de la incubación se añadió EDTA 10 mM y las muestras se centrifugaron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para obtener el plasma, que posteriormente se almacenó en alícuotas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el ensayo ELISA para la determinación de citoquinas. Los niveles de liberación de TNF- $\alpha$  en cultivo de sangre completa de rata se evaluaron utilizando el kit ELISA Rat TNF $\alpha$  (Diacclone, Francia).  
40 En comparación con la curva patrón de referencia, los niveles de TNF- $\alpha$  en las muestras se expresaron como la concentración (pg/ml).

## RESULTADOS

- 45 Se demostró la inversión dependiente de la concentración del efecto de PGE2 sobre la liberación de TNF- $\alpha$  por parte del Compuesto 1 *in vitro*. Una curva del Compuesto 1 (0,1-30  $\mu\text{M}$ ) hacia una concentración fija de PGE2 que determina aproximadamente el 80 % de la inhibición de la liberación de TNF- $\alpha$  permitió calcular un valor de  $CI_{50}$  de 2,3  $\mu\text{M}$  como se muestra en la Figura 6.

## CONCLUSIONES

El efecto inhibitorio de PGE2 con respecto a la producción de TNF- $\alpha$  inducida por LPS fue útil para demostrar *in vitro* la

actividad del Compuesto 1 antagonista de EP4. Los resultados obtenidos en estos experimentos subrayan que el Compuesto 1 revierte la reducción de PGE2 de la liberación de TNF- $\alpha$  en células sanguíneas estimuladas con LPS.

#### Ejemplo 6

Liberación de TNF- $\alpha$  *ex vivo* inducida por LPS: relación lineal entre la inhibición por PGE2 (CI<sub>50</sub>) y la dosis de tratamiento del Compuesto 1

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se alojaron seis ratas Wistar Han macho (250-300 g de peso corporal, Charles River, Italia) por jaula en una habitación con temperatura controlada, configurada para mantener la temperatura dentro del rango de 20 °C  $\pm$  2 °C y la humedad relativa dentro del rango de 55 %  $\pm$  10 y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h. A lo largo del estudio, los animales tuvieron libre acceso a comida de laboratorio estándar (dieta de roedores Teklad 2018, Harlan Laboratories, S. Pietro al Natisone, UD, Italia) y agua potable. El cuidado y manejo de los animales estuvo de acuerdo con las directrices de las autoridades locales y las regulaciones de la Comunidad Europea.

La autorización para los procedimientos experimentales fue otorgada por el Ministerio de Salud italiano. La modulación del efecto de PGE2 (Cayman Chemical) sobre la liberación de TNF- $\alpha$  *ex vivo* se evaluó utilizando muestras de cultivo de sangre completa de animales tratados por vía oral con vehículo o Compuesto 1 a diferentes dosis, y se recogieron 1 hora después de la dosificación.

En detalle, el día de los experimentos los animales se anestesiaron con un 2,5-3% de isoflurano en O<sub>2</sub> dentro de una cámara de inducción y se extrajo sangre (en promedio 7 ml/rata) de la aorta abdominal. Las muestras de sangre completa se recogieron en tubos que contenían 0,1-0,2 U/ml de heparina. Se dispensaron alícuotas (0,5 ml) en una serie de tubos y, tras la adición de LPS (muestras de control) o una mezcla de 0,1  $\mu$ g/ml de LPS + diferente concentración de PGE2, las muestras se incubaron a 37 °C en un incubador con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas. En la muestra que representaba la liberación basal de citoquinas, se sustituyó el LPS por el mismo volumen de PBS estéril. Se prepararon LPS y PGE2 como una disolución madre 100X en PBS+BSA estéril al 0,2 %. Al final de la incubación se añadió EDTA 10 mM, las muestras se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos a 4 °C, se extrajo el plasma y se almacenó en alícuotas a -80 °C hasta el ensayo ELISA para la determinación de citoquinas. Para analizar los niveles de liberación de TNF- $\alpha$  en cultivo de sangre completa de rata, se utilizó el kit Rat TNF $\alpha$  ELISA (Diacclone, Francia). En comparación con la curva patrón de referencia, los niveles de TNF- $\alpha$  en las muestras se expresaron como la concentración (pg/ml).

Para cada animal, se calculó el porcentaje de inhibición por las diferentes concentraciones de PGE2 respecto a la muestra control, y la CI<sub>50</sub> correspondiente (o la mitad de la concentración inhibitoria máxima en un rango del 0-100% de inhibición) mediante un análisis de regresión lineal. Además, en cada grupo de tratamiento se calcularon los niveles medios de TNF- $\alpha$  y el % medio de inhibición por PGE2. Se realizó un ANOVA bidireccional para determinar el efecto estadísticamente significativo de cada dosis-tratamiento con respecto al grupo de vehículo y considerando cada punto de la curva de inhibición por PGE2.

Los valores de CI<sub>50</sub> media para cada grupo se representaron en función de la dosis del compuesto 1 administrada, con el fin de calcular mediante un análisis de regresión lineal la relación entre la dosis del compuesto 1 y la CI<sub>50</sub> de PGE2 resultante.

#### RESULTADOS

Con el objetivo de demostrar la actividad moduladora del Compuesto 1 con respecto al conocido efecto inhibitorio de PGE2 sobre la liberación de TNF- $\alpha$ , se implementó un modelo *ex vivo* basado en cultivos de sangre completa estimulados con LPS. En particular, se evaluó el efecto *ex vivo* del Compuesto 1 administrado por vía oral en cinco dosis diferentes, que van desde 10 mg/kg hasta 300 mg/kg, hacia una curva de inhibición por PGE2, para calcular un cambio de la CI<sub>50</sub> del agonista en presencia del antagonista. La producción de TNF- $\alpha$  inducida por LPS a 0,1  $\mu$ g/ml se midió después de 24 horas de estimulación *ex vivo*. El muestreo de sangre de 1 hora fue elegido como representativo del t<sub>máx</sub> del Compuesto 1 y las dosis bajas utilizadas (10-30 mg/kg) fueron acordes a su actividad farmacológica, medida previamente en modelos de artritis reumatoide en ratas.

PGE2 inhibió la liberación de citoquinas y la presencia del Compuesto 1 en sangre, interactuando con EP4R, determinó una reversión estadísticamente significativa de este efecto. Se calculó el valor de CI<sub>50</sub> de PGE2 para el vehículo y se observó un aumento de este valor de 3 a 9 veces como consecuencia del tratamiento con el Compuesto 1. La relación lineal entre la dosis del Compuesto 1 y el valor de CI<sub>50</sub> de PGE2 se representa en la Figura 7.

De acuerdo con la unión al objetivo del Compuesto 1 con el EP4R de rata, el análisis de la liberación *ex vivo* de TNF- $\alpha$  inducida por LPS, inhibida por PGE2 y modulada por el Compuesto 1 se centró con respecto a la baja concentración nanomolar de PGE2, ya que estos son representativos del rango de concentraciones que normalmente se observan en el microambiente tumoral. Al representar gráficamente los efectos inhibitorios sobre la liberación de TNF- $\alpha$  determinados por PGE2 frente a las dosis administradas del Compuesto 1, se observó una reversión global dependiente de la dosis para ambas concentraciones de PGE2. Los resultados se informan en la Figura 8.

Además, un curso de tiempo (1 - 3 - 24 horas) del análisis de muestras de sangre resaltó la unión duradera del EP4R con la dosis mínima efectiva de 10 mg/kg del Compuesto 1 ya que, como se puede observar en el gráfico de la Figura 9, aunque se pudo observar una ligera disminución dependiente del tiempo del efecto del Compuesto 1, la reversión de la inhibición de la liberación de TNF- $\alpha$  por PGE2 todavía era evidente también 24 horas después de la administración del Compuesto 1.

## CONCLUSIONES

El efecto inhibitorio de PGE2 con respecto a la producción de TNF- $\alpha$  inducida por LPS fue útil para demostrar la actividad del Compuesto 1 antagonista de EP4. En general, estos resultados demuestran claramente la capacidad del Compuesto 1 de revertir la inhibición de la liberación de TNF- $\alpha$  inducida por PGE2 en las células sanguíneas. De hecho, en experimentos *ex vivo*, en los que las muestras de sangre derivadas de animales tratados oralmente con vehículo (control) o Compuesto 1 y recolectadas 1 hora después de la dosificación, la presencia del compuesto 1 determinó una reversión estadísticamente significativa del efecto esperado de PGE2. Además, la reversión de la inhibición de la liberación de TNF- $\alpha$  por PGE2 seguía siendo evidente también 24 horas después de la administración del Compuesto 1.

### Ejemplo 7

*Efectos ex vivo del tratamiento único con el Compuesto 1 y el Compuesto 2 sobre la liberación de TNF $\alpha$  inducida por LPS e inhibida por PGE2, 24 horas después de la dosificación*

La modulación del efecto de PGE2 sobre la liberación de TNF- $\alpha$  *ex vivo* se evaluó utilizando muestras de cultivo de sangre completa de ratas Wistar Han (275-300 g de peso corporal) tratadas por vía oral con el vehículo, el Compuesto 1 o el compuesto del ejemplo 2, ambos administrados a 10 mg/kg. Se recogieron muestras de sangre 24 horas después de la dosificación.

Se alojaron seis animales por jaula en una habitación con temperatura controlada, configurada para mantener la temperatura dentro del rango de 20 °C  $\pm$  2 °C y la humedad relativa dentro del rango del 55 %  $\pm$  10 y con un ciclo luz/oscuridad de 12 h/12 h/. A lo largo del estudio, los animales tuvieron libre acceso a comida de laboratorio estándar (dieta de roedores Teklad 2018, Harlan Laboratories, S. Pietro al Natisone, UD, Italia) y agua potable. El cuidado y manejo de los animales estuvo de acuerdo con las directrices de las autoridades locales y las regulaciones de la Comunidad Europea. La autorización para los procedimientos experimentales fue otorgada por el Ministerio de Salud italiano.

En detalle, el día de los experimentos los animales fueron anestesiados con un 2,5-3% de isoflurano en O<sub>2</sub> dentro de una cámara de inducción y se extrajo sangre de la aorta abdominal. Las muestras se recogieron en tubos que contenían 0,1-0,2 U/ml de heparina, se dispensaron alícuotas (0,5 ml) en una serie de tubos, y después de la adición de LPS a 0,1  $\mu$ g/ml (muestras de control) o una mezcla de LPS + diferentes concentraciones de PGE2, se incubaron a 37 °C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5% durante 4 horas. En las muestras que representaban la liberación basal de citoquinas, se sustituyó el LPS por el mismo volumen de PBS estéril. Se prepararon LPS y PGE2 como una disolución madre en PBS+BSA estéril al 0,2 %. Al final de la incubación se añadió EDTA 10 mM, las muestras se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos a 4 °C, se extrajo el plasma y se almacenó en alícuotas a -80 °C hasta el ensayo ELISA para determinación de citoquinas (Diaclone France).

## RESULTADOS

Se analizaron los valores obtenidos de CI<sub>50</sub> para PGE2 en los grupos de control (vehículo) o tratados. La presencia del Compuesto 1 en sangre, 24 horas después de la administración, determinó una reversión estadísticamente significativa de la inhibición por PGE2 de la liberación de TNF $\alpha$  inducida por LPS, con respecto al grupo tratado con vehículo (Figura 10), de hecho, se observaron un cambio estadísticamente significativo de 9 veces en los valores de CI<sub>50</sub> para PGE2. Por el contrario, en presencia del Compuesto 2, solo se observó un cambio moderado, no estadísticamente significativo, de los valores de CI<sub>50</sub>, con respecto al grupo tratado con vehículo. Ambos compuestos no interfirieron *per se* en la liberación de citoquinas.

## CONCLUSIONES

El efecto inhibitorio de PGE2 con respecto a la producción de TNF- $\alpha$  inducida por LPS fue útil para demostrar la actividad de los antagonistas de EP4. El compuesto 1 pudo revertir el efecto inhibitorio de PGE2 sobre la liberación de TNF- $\alpha$  24 horas después de la administración oral única. Por el contrario, el compuesto del ejemplo 2 solo redujo ligeramente la inhibición por PGE2 sin significación estadística.

### Ejemplo 8

*Efecto ex vivo de la administración repetida del Compuesto 1 sobre la liberación de TNF- $\alpha$  inducida por lipopolisacárido y modulada por prostaglandina E2*

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se alojaron seis ratas Wistar Han macho (250-300 g de peso corporal; Charles River, Italia) por jaula en una habitación

con temperatura controlada, configurada para mantener la temperatura dentro del rango de  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y la humedad relativa dentro del rango de  $55\% \pm 10$  y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h. A lo largo del estudio, los animales tuvieron libre acceso a comida de laboratorio estándar (dieta de roedores Teklad 2018, Harlan Laboratories, S. Pietro al Natisone, UD, Italia) y agua potable. El cuidado y manejo de los animales estuvo de acuerdo con las directrices de las autoridades locales y las regulaciones de la Comunidad Europea. La autorización para los procedimientos experimentales fue otorgada por el Ministerio de Salud italiano. Se evaluó la modulación del efecto de PGE2 en la liberación de TNF- $\alpha$  ex vivo usando muestras de cultivo de sangre completa de animales tratados por vía oral, una vez al día durante 8 días con vehículo o Compuesto 1 a 10 mg/kg, y recolectadas 24 horas después del último tratamiento.

En detalle, el día de los experimentos, los animales fueron anestesiados con un 2,5-3% de isoflurano en  $\text{O}_2$  dentro de una cámara de inducción y se extrajo sangre de la aorta abdominal. Las muestras de sangre completa se recogieron en tubos que contenían 0,1-0,2 U/ml de heparina. Se dispensaron alícuotas (0,4 ml) en una serie de tubos precalentados a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, y tras la adición de LPS (Control) o una mezcla de LPS + diferentes concentraciones de PGE2, las muestras se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una incubadora con  $\text{CO}_2$  al 5% durante 4 horas. En las muestras que representaban la liberación basal de la citocina, se sustituyó el LPS por el mismo volumen de PBS estéril. Se prepararon LPS y PGE2 como una disolución madre 100X en PBS+BSA estéril al 0,2 %. Al final de la incubación se añadió EDTA 10 mM, las muestras se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el plasma se extrajo y se almacenó en alícuotas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el ensayo ELISA para la determinación de citoquinas.

Los niveles de liberación de TNF- $\alpha$  en cultivo de sangre completa de rata se evaluaron utilizando el kit ELISA Rat TNF $\alpha$  (Diacione, Francia).

En comparación con la curva patrón de referencia, los niveles de TNF- $\alpha$  en las muestras se expresaron como la concentración (pg/ml). Para cada animal, se calculó el porcentaje de inhibición por diferentes concentraciones de PGE2 respecto a la muestra control, y la correspondiente  $\text{CI}_{50}$  (o la mitad de la concentración inhibitoria máxima en un rango del 0-100% de inhibición) mediante un análisis de regresión lineal. Además, en cada grupo de tratamiento se calcularon los niveles medios de TNF- $\alpha$  o el % medio de inhibición por PGE2. La curva de inhibición por PGE2 se comparó gráficamente y se calcularon los valores de  $\text{CI}_{50}$  media para cada grupo.

## RESULTADOS

El efecto del Compuesto 1 (10 mg/kg) administrado por vía oral una vez al día durante 8 días hacia la inhibición por PGE2 se evaluó 24 horas después del último tratamiento. La presencia del Compuesto 1 en sangre confirmó una reversión estadísticamente significativa del efecto inhibitorio de PGE2, de hecho, los valores de  $\text{CI}_{50}$  en el grupo de control tratado solo con vehículo son significativamente más bajos que los valores de  $\text{CI}_{50}$  del grupo tratado con el Compuesto 1 a 10 mg/kg. En particular, se observó un aumento de 5 veces y estadísticamente significativo de los valores de  $\text{CI}_{50}$  media en el grupo tratado con el Compuesto 1 con respecto a los valores de  $\text{CI}_{50}$  de los controles como se muestra en la Figura 11.

## CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio demuestran que el tratamiento con dosis repetidas del compuesto 1 puede modular la inhibición inducida por PGE2 de la liberación de TNF- $\alpha$  en células sanguíneas de rata incluso 24 horas después de la última dosificación.

### *Ejemplo 9*

#### *Expresión de TNF- $\alpha$ en cultivo in vitro de macrófagos humanos*

## MATERIAL Y MÉTODOS

La línea celular de monocitos humanos THP-1, obtenida de la ATCC, se cultivó de acuerdo con las instrucciones proporcionadas. Las células THP-1 se diferenciaron hasta macrófagos con 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) 100 nM (Sigma Aldrich) durante 4 días. A continuación, se estimularon los macrófagos con lipopolisacárido (LPS) (Sigma Aldrich) a 10 ng/ml y PGE2 0,01  $\mu\text{M}$  durante 3 horas. Se purificó el ARN total con el kit ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y se retrotranscribió con el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Thermo Fisher Scientific). El análisis de RT-PCR se realizó con el sistema de PCR rápido en tiempo real 7500 de Applied Biosystems con ensayos TaqMan específicos (número Hs00174128\_m1; Thermo Fisher Scientific) y, como control endógeno, el ensayo 18S Pre-Developed TaqMan® (Thermo Fisher Scientific). El análisis de datos, con normalización en los valores amplificados de 18S, se realizó siguiendo las instrucciones específicas de Thermo Fisher Scientific para la cuantificación relativa de la expresión génica. Todos los datos individuales son el resultado de al menos tres análisis diferentes para cada muestra.

## RESULTADOS

Para evaluar el potencial del Compuesto 1 de contrarrestar la inhibición inducida por PGE2 de la expresión del gen TNF- $\alpha$  en macrófagos humanos, las células THP-1 se diferenciaron hasta macrófagos y posteriormente se trataron con LPS a 10 ng/ml más PGE2 10 nM  $\pm$  Compuesto 1 en el rango de concentraciones 0,01  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  durante 3 horas.

Como se muestra en el gráfico de la Figura 12, que informa del porcentaje de expresión del gen TNF- $\alpha$  en comparación con los macrófagos humanos estimulados con LPS + PGE2 (establecido en 100%), el Compuesto 1 aumentó los niveles de expresión del gen TNF- $\alpha$ , logrando un aumento de dos a tres veces con respecto a las células tratadas con PGE2+LPS sólo a una concentración tan baja como 0,1  $\mu$ M.

## 5 CONCLUSIONES

Estos datos proporcionan evidencia de que el Compuesto 1 modula los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  y contrarresta la inhibición de la expresión de TNF- $\alpha$  inducida por PGE2 en células inmunitarias humanas tales como macrófagos.

*Ejemplo 10:*

*Efecto del compuesto 1 sobre la expresión de RANK-L en líneas celulares de cáncer*

## 10 MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron células de adenocarcinoma de glándula mamaria humana MDA-MB-231 de la ATCC y se cultivaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.

15 Las células se trataron con PGE2 10  $\mu$ M  $\pm$  Compuesto 1 10  $\mu$ M durante 24 horas. El ARN total se purificó con el kit ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y se retrotranscribió con el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Thermo Fisher Scientific). El análisis de RT-PCR se realizó con el sistema de PCR rápido en tiempo real 7500 de Applied Biosystems con ensayos TaqMan específicos (Hs00243522\_m1; Thermo Fisher Scientific) y, como control endógeno, el ensayo 18S Pre-Developed TaqMan® (Thermo Fisher Scientific). El análisis de datos, con normalización en valores amplificados de 18S, se realizó siguiendo las instrucciones específicas de Thermo Fisher Scientific para la cuantificación relativa de la expresión génica. Todos los datos individuales son el resultado de al menos tres análisis diferentes para cada muestra.

20

## RESULTADOS

Para evaluar si el Compuesto 1 podría revertir el aumento de la expresión del gen RANK-L inducido por PGE2 en células cancerosas, se empleó un modelo basado en células de cáncer de mama humano.

25 Las células MDA-MB-231 tratadas con PGE2 10  $\mu$ M  $\pm$  Compuesto 1 10  $\mu$ M durante 24 horas y los niveles de expresión del gen RANKL se evaluaron mediante RT-PCR cuantitativa.

Los resultados se muestran en la Figura 13, donde se muestra el porcentaje medio de expresión de RANK-L en comparación con las células estimuladas con PGE2 10  $\mu$ M ajustado al 100 %. El compuesto 1 disminuyó notablemente el nivel de expresión del gen RANK-L.

## CONCLUSIONES

30 Los datos obtenidos proporcionan evidencia de que el Compuesto 1, al contrarrestar el efecto de PGE2, reduce la expresión del gen RANK-L en células cancerosas humanas.

*Ejemplo 11:*

*Reducción ex vivo de la diferenciación de células Th-17 humanas*

## MATERIAL Y MÉTODOS

35 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de voluntarios sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad y se enriquecieron las células T CD4+ indiferenciadas a partir de PBMC utilizando el kit de aislamiento de células T CD4+ indiferenciadas humanas (Miltenyi Biotech). Los linfocitos T CD4+ aislados se mantuvieron en medio RPMI y se diferenciaron hacia linfocitos Th-17 mediante estimulación con IL-12 e IL-2, ambas a 5 ng/ml en combinación con 1,5 ng/ml de anticuerpos anti CD3 y anti CD28 y 0,03  $\mu$ M de PGE2  $\pm$  Compuesto 1 a una concentración de 0,01 - 0,03 - 0,1 - 0,3  $\mu$ M durante 48 horas.

40

Al final del tiempo de incubación, las células se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluorescencia específicos para CD4, CCR6, CD45, CD25 e IL-17 (todos de BD Bioscience). Finalmente, se determinó el número de células Th-17 mediante citometría de flujo y los eventos se midieron mediante un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS; BD Bioscience) y se analizaron con un programa informático especializado.

## 45 RESULTADOS

Los resultados obtenidos se informan en la Figura 14, donde se representa gráficamente la frecuencia de las células Th-17 F+ respecto de las concentraciones del Compuesto 1. El compuesto 1 indujo de forma dependiente de la dosis una marcada disminución en el número de células Th-17 indiferenciadas, alcanzando una meseta de efecto máximo a concentraciones superiores a 0,1  $\mu$ M.

## CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos proporcionan evidencia de que el Compuesto 1 modula negativamente la diferenciación de células Th-17.

*Ejemplo 12:*

### 5 *Diferenciación de células T reguladoras humanas ex vivo*

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de voluntarios sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad y se enriquecieron las células T CD4+ indiferenciadas a partir de PBMC utilizando el kit de aislamiento de células T CD4+ indiferenciadas humanas (Miltenyi Biotech). Los linfocitos T CD4+ aislados se mantuvieron en medio RPMI y se diferenciaron hacia un fenotipo Treg utilizando dos interleucinas, a saber, rIL23 y rIL-1 $\beta$ , ambas a una concentración de 10 ng/ml y se coestimularon con PGE2 a una concentración de 30 nM durante un período de incubación de 144 horas.

Al final de la incubación, las células se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluorescencia específicos de CD3, CD4, FoxP3, CD25, IL35 y CRTH2 (todos de BD Bioscience). Finalmente, se determinó el número de células Treg mediante citometría de flujo y los eventos se midieron mediante un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS; BD Bioscience) y se analizaron con un programa informático especializado.

#### RESULTADOS

Se ha descubierto que las células T reguladoras (Treg), un subconjunto de las células T CD4+, desempeñan un papel clave en el mantenimiento del microambiente tumoral supresor y, por lo tanto, contribuyen a la progresión del cáncer (Shindo, Y. et al. *Anticancer Res.* 35, 129-136 (2015)). PGE2 es un inductor bien conocido de la diferenciación de células FoxP3 (Zhang, L. et al. *Cell Biol. Int.* 38, 639-646 (2014)). Los datos informados aquí subrayaron la eficacia del Compuesto 1 para disminuir la diferenciación *ex vivo* de las células Treg inducida por PGE2. De hecho, mientras que 0,03  $\mu$ M de PGE2 promovió significativamente la diferenciación de células FoxP3 positivas, 0,1  $\mu$ M de Compuesto 1 disminuyó significativamente la diferenciación de células Th-3, como se muestra en la Figura 15. Las células Th-3 son un subconjunto particular de células T reguladoras cuya activación y expansión en el cáncer se correlaciona con el peor pronóstico. (Durán-Aniotz, C. et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 761-772 (2013)). Además, se observó una inhibición similar de la diferenciación inducida por PGE2 para otra subpoblación de células Treg, es decir, células iT35, como se indica en la Figura 16. Las células iT35 se caracterizan por la producción y liberación del potente factor inmunosupresor IL-35. Además, las células iT35 a menudo se encuentran a niveles elevados en el cáncer de mama y colorrectal, donde participan en la inmunotolerancia tumoral a través de la supresión de la proliferación de células T efectoras (Hao, S. et al. *Carcinogenesis* 39, 1488-1496 (2018); Ma, Y. et al. *Oncotarget* 7, 73003-73015 (2016)).

## CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos proporcionan evidencia de que el Compuesto 1 regula negativamente la diferenciación de las células T reguladoras, por lo que los resultados mostrados sustentan firmemente la aplicación de este compuesto en la terapia inmuno-oncológica con el objetivo de restaurar la respuesta inmune contra las células cancerosas.

## REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica que comprende el antagonista de EP4 de Fórmula ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)-benzoico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios.
- 5 2. La combinación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la sal farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en clorhidrato, sal de sodio, sal de potasio y sal de litio.
3. La combinación farmacéutica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el antagonista de EP4 es la sal sódica del ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaespiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil) benzoico.
- 10 4. Una forma polimórfica A de la sal de sodio del ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico caracterizada por un espectro de XRD de polvo con picos en valores del ángulo  $2\theta \pm 0,2^\circ$  de 4,3, 5,0, 5,8, 6,4, 7,1, 8,3, 8,7, 12,8, 15,3, 15,9.
5. La forma polimórfica A según la reivindicación 4 para el uso como un medicamento.
6. La forma polimórfica A según la reivindicación 4 para el uso en el tratamiento de tumores.
- 15 7. Una combinación farmacéutica que comprende la forma polimórfica A de la sal de sodio del ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico según la reivindicación 4 y al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios.
8. La combinación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 7, en la que el al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios se selecciona del grupo que consiste en PD-1 (muerte programada-1), PD-L1 (muerte programada-ligando 1), CTLA-4 (antígeno de linfocitos T citotóxicos - 4), TIM3 (inmunoglobulina de células T y mucina-3), OX-40 y su ligando OX40L, LAG-3 (gen de activación de linfocitos-3), KIR (receptor de tipo inmunoglobulina de células citotóxicas), VISTA (supresor de la activación de células T que contiene Ig de dominio V), IDO1 (indolamina 2,3-dioxigenasa), TIGIT (inmunoglobulina de células T y dominio ITIM), BTLA (atenuador de linfocitos B y T), A2AR (receptor de adenosina A2), SIGLEC7 (lectina 7 de tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico), GTR (gen relacionado con la familia TNFR inducido por glucocorticoides), ICOS (coestimulador de células T inducible), NOX-2 (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato NADPH oxidasa, isoforma 2), Arginasa I, CD276 (grupo de diferenciación 276, también denominado B7H4), CD27 (grupo de diferenciación 27) y su ligando CD27 (grupo de diferenciación 27), CD160 (grupo de diferenciación 160) y CD39 (grupo de diferenciación 39).
- 20 9. La combinación farmacéutica según la reivindicación 8, en la que el al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos neutralizantes anti PD-1 (p. ej., Nivolumab (Opdivo), Pembrolizumab (Keytruda)), anti CTLA-4 (p. ej., ipilimumab, Tremelimumab), anticuerpos anti TIM-3 (p. ej., MBG453) o anticuerpos anti LAG-3.
- 25 10. Una combinación farmacéutica que comprende un antagonista de EP4 seleccionado de ácido (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoico o una sal farmacéuticamente aceptable y al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios para su uso en el tratamiento de tumores.
- 30 11. Una combinación farmacéutica que comprende el antagonista de EP4 que consiste en la forma polimórfica A de (R)-4-(1-(6-(4-(trifluorometil)bencil)-6-azaspiro[2.5]octano-5-carboxamido)ciclopropil)benzoato de sodio según la reivindicación 4 y al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios para el uso en el tratamiento de tumores.
- 35

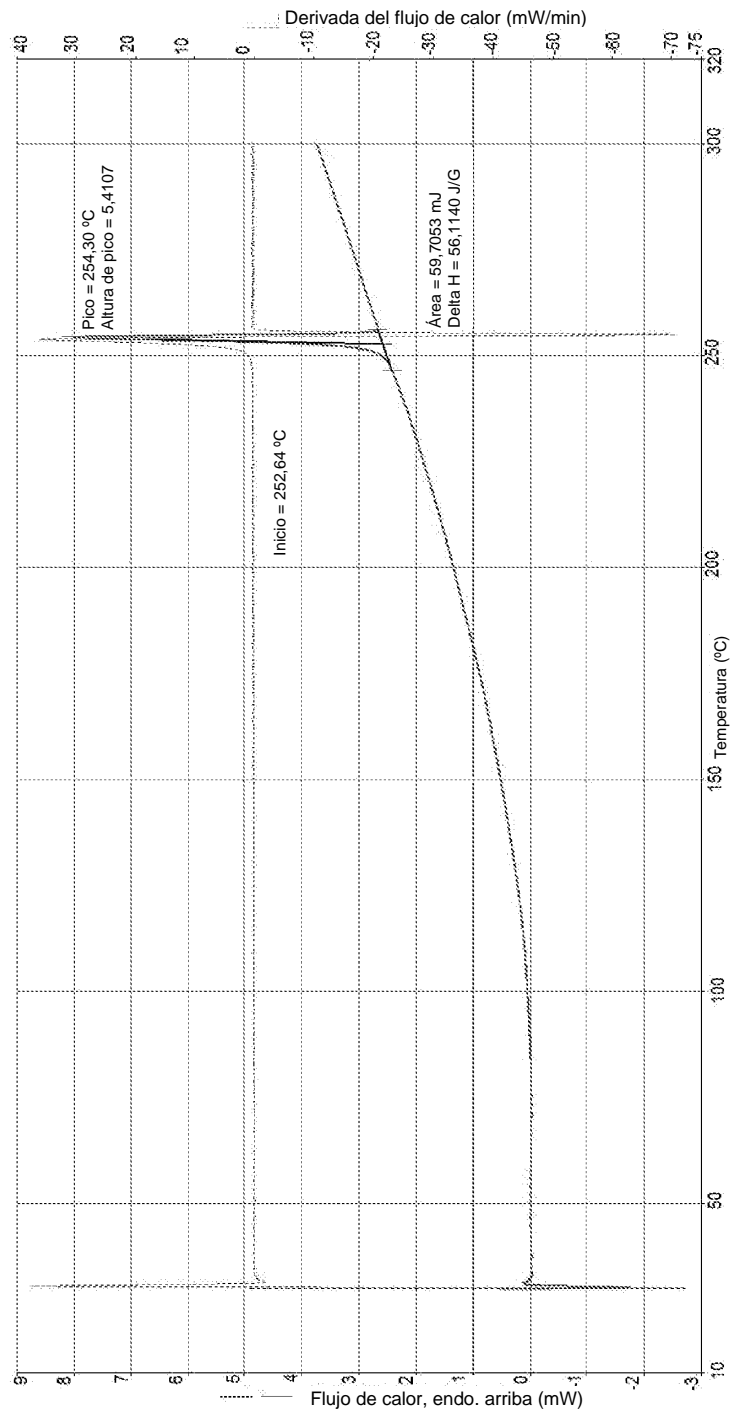


Figura 1

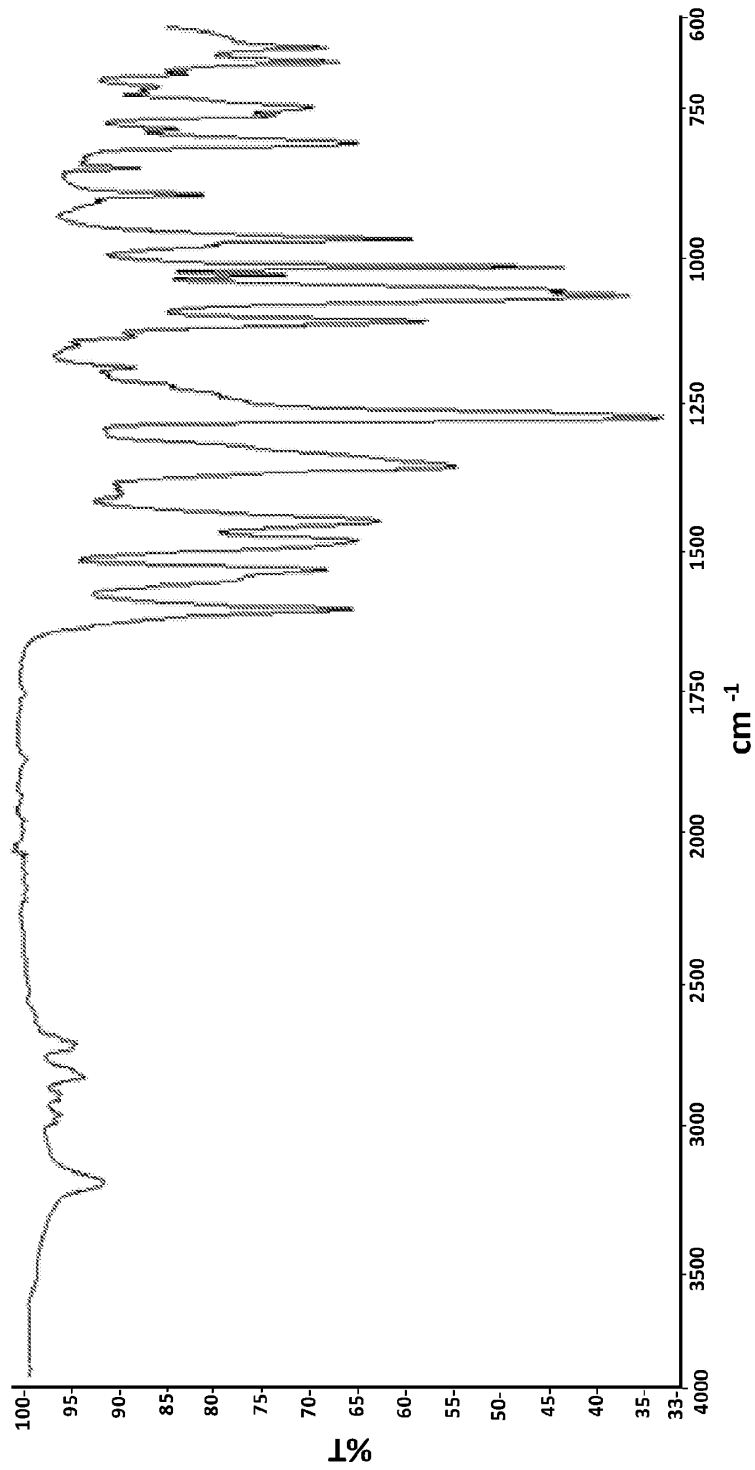


Figura 2

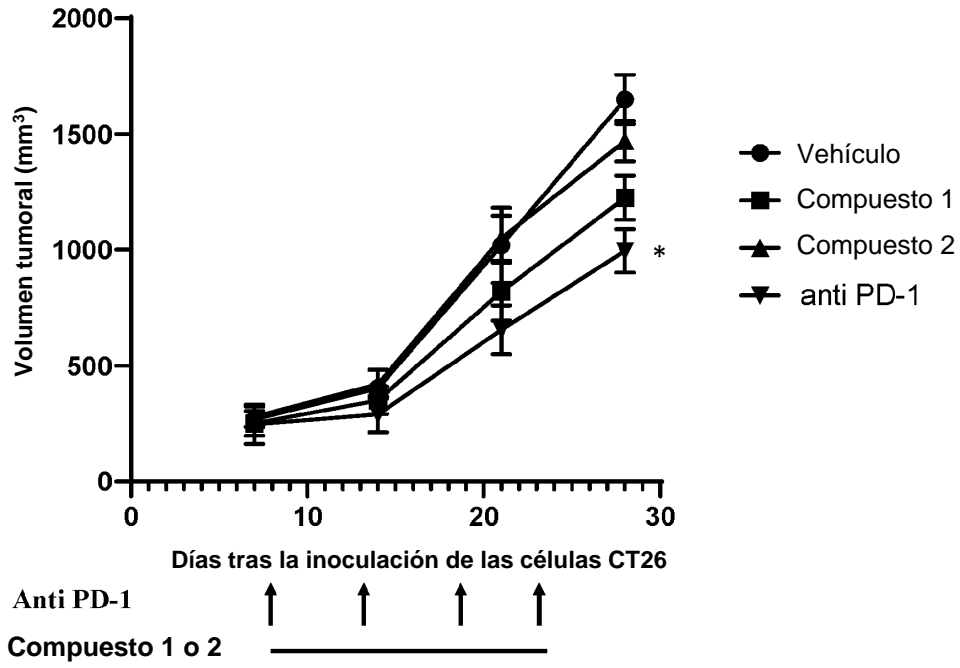


Figura 3

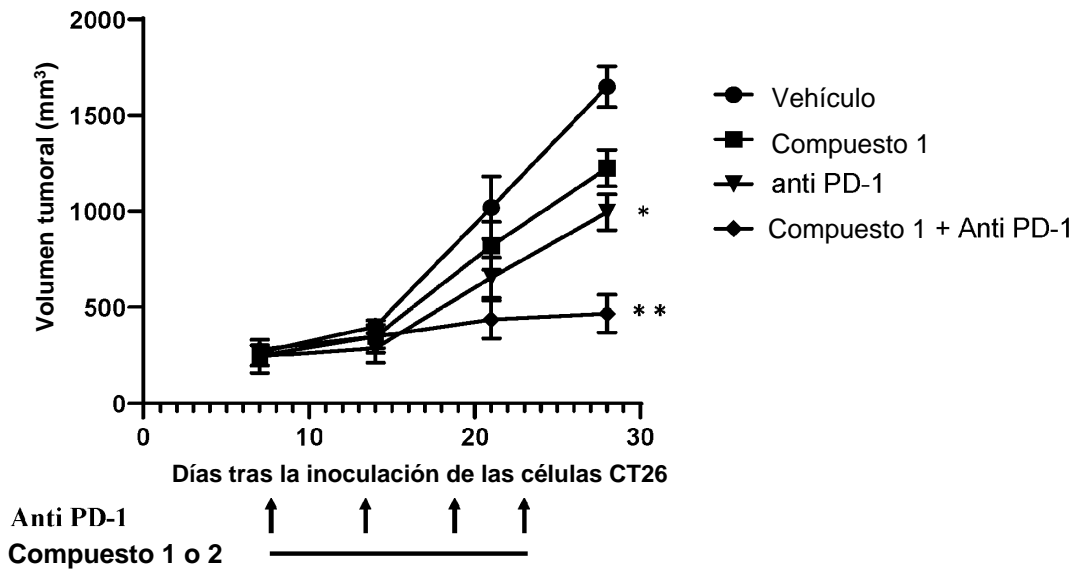


Figura 4

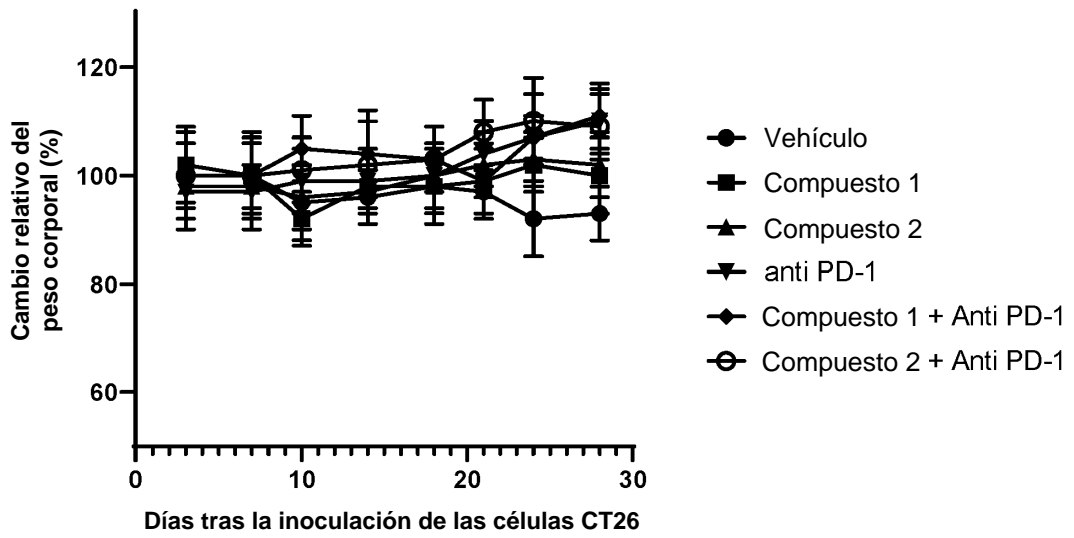


Figura 5

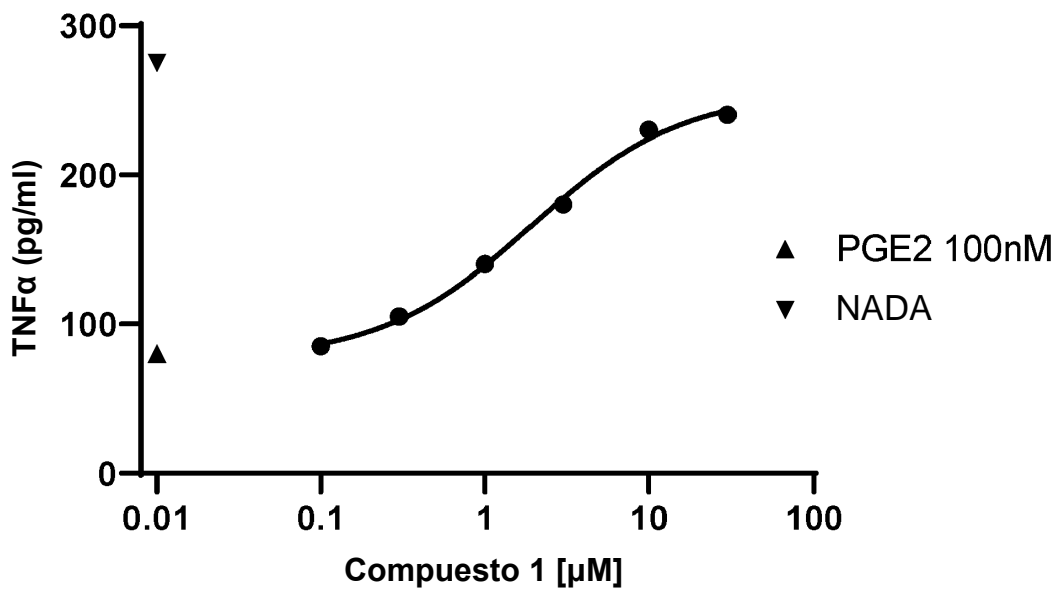


Figura 6

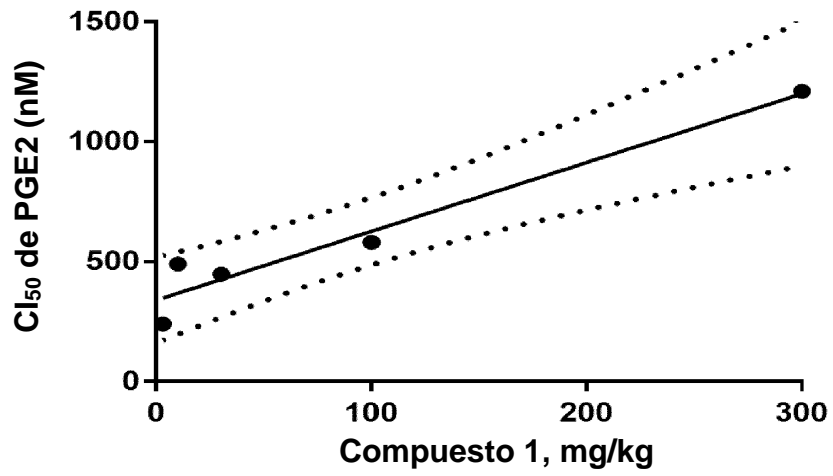


Figura 7

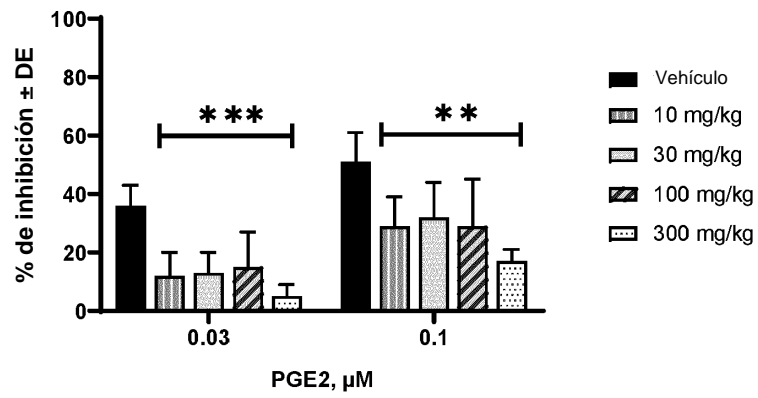


Figura 8

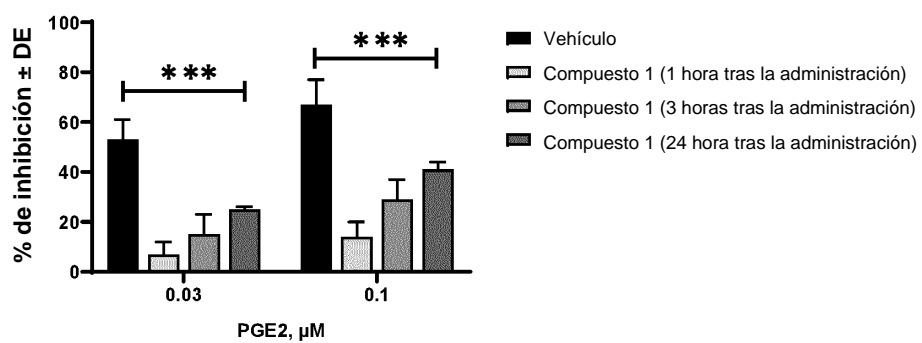


Figura 9

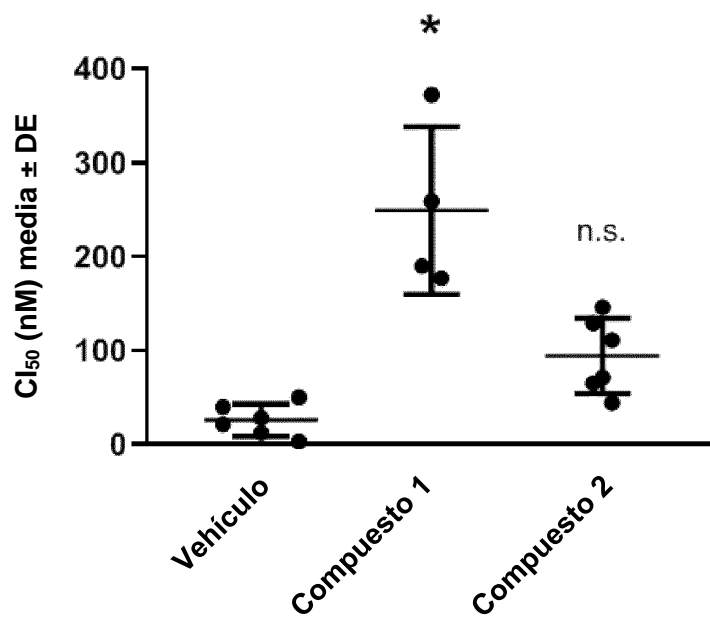


Figura 10

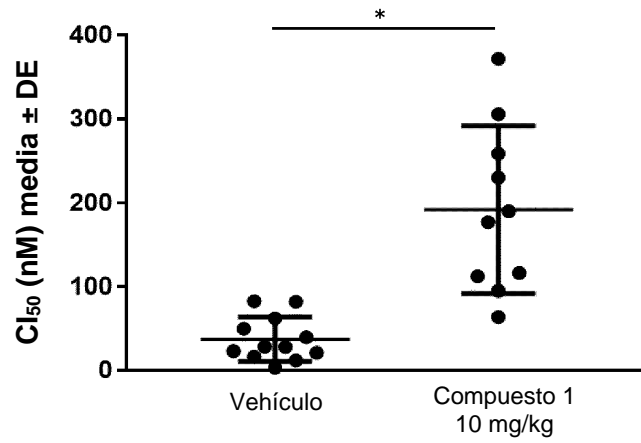


Figura 11

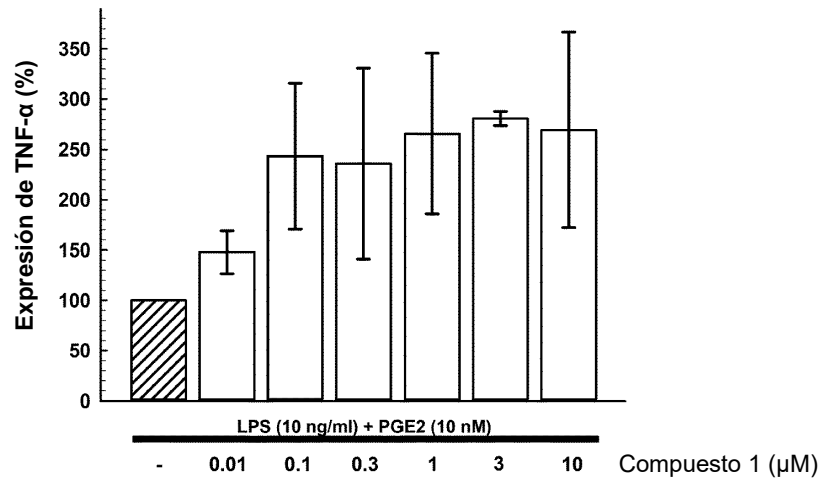


Figura 12

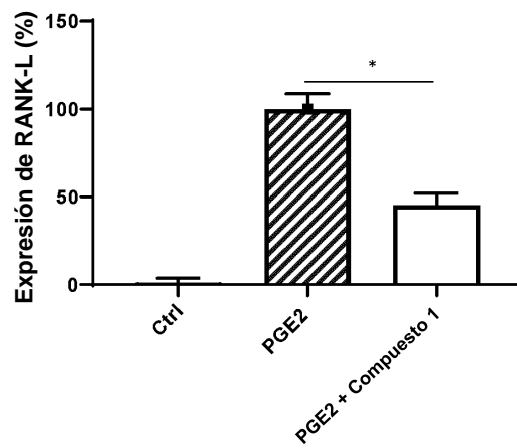


Figura 13

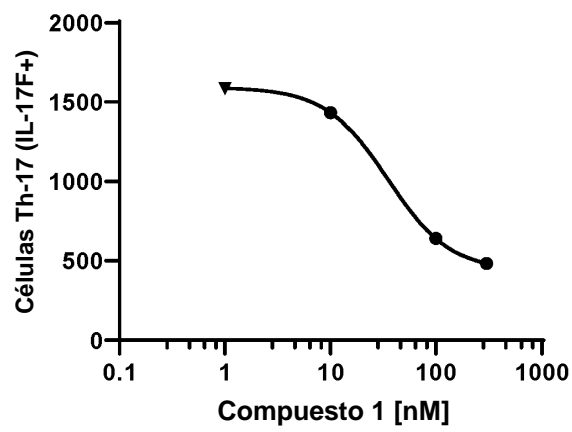


Figura 14

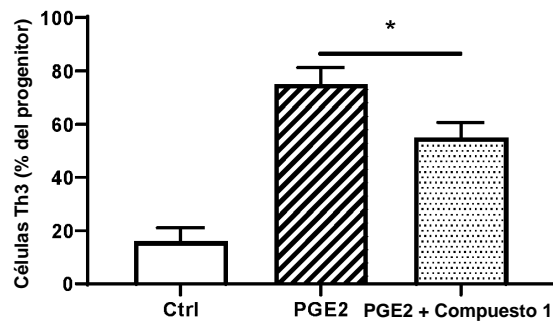


Figura 15

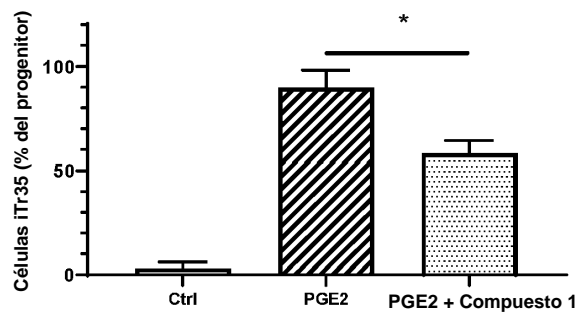


Figura 16