

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 029 183**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/165** (2006.01)

**A61K 31/19** (2006.01)

**A61K 31/426** (2006.01)

**A61P 35/04** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2018 PCT/EP2018/078971**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2019 WO19081470**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2018 E 18795414 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2025 EP 3700514**

54 Título: **Combinación de inhibidores de IL-8 e inhibidores de IL-6/GP-130 para la utilización en el tratamiento de metástasis pulmonares asociadas a osteosarcoma**

30 Prioridad:  
**24.10.2017 EP 17198072**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.06.2025**

73 Titular/es:  
**DOMPÉ FARMACEUTICI S.P.A. (50.00%)  
Via S. Martino della Battaglia, 12  
20122 Milano, IT y  
THE RESEARCH INSTITUTE AT NATIONWIDE  
CHILDREN'S HOSPITAL (50.00%)**

72 Inventor/es:  
**ROBERTS, RYAN, DAVID y  
BRANDOLINI, LAURA**

74 Agente/Representante:  
**ISERN JARA, Jorge**

ES 3 029 183 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 de inhibidores de IL-8 e inhibidores de IL-6/GP-130 para la utilización en el tratamiento de metástasis pulmonares asociadas a osteosarcoma

Campo técnico

La presente invención se refiere a un producto o kit para la utilización en la prevención y/o tratamiento de metástasis pulmonares asociadas a osteosarcoma, en donde el producto o kit comprende: A) un inhibidor de IL-8, y B) por lo menos un inhibidor de IL-6 y/o por lo menos un inhibidor de gp130, en donde A) y B) son dos formulaciones separadas para la utilización simultánea, separada o secuencial. La invención se refiere, además, a una composición farmacéutica para la utilización en la prevención y/o tratamiento de metástasis pulmonares asociada a osteosarcoma, que comprende un inhibidor de IL-8 y excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, en donde la composición farmacéutica comprende, además, por lo menos un inhibidor de IL-6 y/o por lo menos un inhibidor de gp130.

Antecedentes de la técnica

Los sarcomas de hueso y tejido blando son un grupo de formas raras y heterogéneas de cáncer, que en conjunto representan aproximadamente el 1 % de todas las neoplasias malignas diagnosticadas. Los sarcomas representan un reto para el médico clínico, ya que son raros y frecuentemente se retrasa el diagnóstico.

Hay más de cien subtipos morfológicos diferentes de sarcoma. Los tipos más comunes de sarcoma óseo son osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing y cordoma. Los sarcomas de tejidos blandos se desarrollan a partir de células de tejidos blandos, incluyendo células de músculo liso (leiomiomas), células adiposas (liposarcomas), tejido conectivo fibroso (fibrosarcomas), músculos esqueléticos (rhabdomiomas), sinovio (sarcomas sinoviales), vasos sanguíneos (angiosarcomas), conductos mamarios (tumores filodes) y nervios (tumores de la vaina nerviosa).

El osteosarcoma (OS) es un neoplasma maligno agresivo que se origina en células primitivas transformadas de origen mesenquimal (y por lo tanto es un sarcoma) y que muestran diferenciación osteoblástica y producen osteoides malignos.

Es la forma histológica más común de cáncer óseo primario y es más prevalente en adolescentes y adultos jóvenes.

Una resección radical y quirúrgica completa, en bloque, del cáncer es el tratamiento de elección en el osteosarcoma. A pesar de que aproximadamente el 90 % de los pacientes pueden someterse a una cirugía de preservación de una extremidad, las complicaciones, particularmente la infección, el aflojamiento del prótesis y la falta de consolidación, o la recurrencia tumoral local pueden llevar a que resulte necesaria una cirugía adicional o una amputación.

La terapia estándar es una combinación de cirugía ortopédica de preservación de extremidad cuando es posible (o amputación en algunos casos) y quimioterapia.

El sarcoma de Ewing (SE) es un tumor óseo altamente agresivo con una incidencia máxima en la población adolescente. Tiene una elevada tendencia a metastatizar, lo que está asociado a tasas de supervivencia muy bajas, de aproximadamente el 25 % (Satterfield, L. et al, Int. J. Cancer, 141: 2062-2075; 2017; Beverly A. Teicher et al, Ann Saudi Med., 31(2): 174-182; 2011).

Los miembros de la familia de tumores de sarcoma de Ewing (FTSE) contienen translocaciones asociadas al tumor que dan lugar a factores de transcripción oncogénicos, siendo el más común EWS/FLI1. EWS/FLI1 desempeña un papel dominante en la progresión tumoral, al modular la expresión de cientos de genes diana. En la presente invención se ha investigado el impacto de la inhibición de EWS/FLI1, mediante inactivación mediada por ARN inhibidor (ARNi), en la señalización celular utilizando fosforoproteómica basada en espectrometría de masas para cuantificar cambios globales en la fosforilación. Este enfoque neutro identifica cientos de fosfopeptidos únicos enriquecidos en procesos como la regulación del ciclo celular y la organización del citoesqueleto. En particular, el perfilado de fosfotirosina revela una regulación positiva elevada de la fosforilación de STAT3 al inactivarse EWS/FLI1. Sin embargo, el análisis de células individuales demuestra que este no es un efecto autónomo celular de la deficiencia de EWS/FLI1, sino más bien un efecto de señalización que ocurre en células en las que no se produce la inactivación. Los medios condicionados de las células con inactivación génica resultaron suficientes para inducir la fosforilación de STAT3 en las células de control, verificando la presencia de un factor soluble que puede activar STAT3. El análisis de citoquinas y los experimentos de inhibición de ligandos/receptores determinaron que ocurría dicha activación, en parte, a través de un mecanismo dependiente de IL6. En conjunto, los datos respaldan un modelo en el que la deficiencia de EWS/FLI1 resulta en la secreción de factores solubles, tales como IL6, que activan la señalización de STAT en células vecinas que mantienen la expresión de EWS/FLI1. Además, se ha mostrado que estos factores solubles protegen frente a la apoptosis (Jennifer L. Anderson et al, Mol Cancer Res; 12(12); 2014; Andrej Lissat et al, BMC Cancer, 15: 552; 2015).

El rhabdomioma (RMS) es una forma agresiva y altamente maligna de cáncer que se desarrolla a partir de células musculares esqueléticas (estriadas) que no han logrado diferenciarse por completo. Se considera generalmente que es una enfermedad de la infancia, ya que la gran mayoría de los casos ocurren en personas menores de 18 años.

A pesar de ser un cáncer relativamente raro, representa aproximadamente el 40 % de todos los sarcomas de tejido blando registrados. El RMS puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo, pero se encuentra principalmente en la cabeza, el cuello, la cavidad orbitaria, el tracto genitourinario, los genitales y las extremidades.

El tratamiento del rhabdomioma es una práctica multidisciplinaria que implica la utilización de cirugía, quimioterapia, radiación y, posiblemente, inmunoterapia. La cirugía es generalmente la primera etapa en un enfoque terapéutico combinado. La resecabilidad es variable, según el sitio del tumor, y el RMS frecuentemente se presenta en sitios que no permiten una resección quirúrgica completa sin una morbilidad y pérdida de función significativas. Menos de 20 % de los tumores de RMS se resecan completamente con márgenes negativos. Afortunadamente, los rhabdomiomas generalmente son quimiosensibles, y aproximadamente el 80 % de los casos responden a la quimioterapia. La quimioterapia multiagente está indicada para todos los pacientes de rhabdomioma. Antes de la utilización de terapia adyuvante y neoadyuvante que involucra agentes quimioterapéuticos, el tratamiento únicamente por medios quirúrgicos presentaba una tasa de supervivencia inferior al 20 %. Las tasas de supervivencia actuales con terapia adyuvante son de aproximadamente 60 % a 70 %.

La metástasis mata a los pacientes a través de tumores sólidos. En ningún caso resulta esto más evidente que en el osteosarcoma. El cáncer óseo mortal del osteosarcoma (OS) mata principalmente a través de la propagación metastásica a los pulmones. Los mecanismos que impulsan este tropismo pulmonar siguen siendo desconocidos. Ya sea que los pacientes presenten enfermedad metastásica evidente en el diagnóstico o que las metástasis surjan muchos años después de completar la terapia, los pacientes con enfermedad localizada disfrutaban de una tasa de supervivencia global a 5 años relativamente favorable del 70 %, mientras que aquellos con metástasis pulmonares sufren una tasa de supervivencia muy reducida, de 15 % a los 2 años (Allison D. C. et al; *Sarcoma* 2012, 704872; 2012).

A pesar de los innumerables intentos por aumentar la terapia o encontrar nuevos tratamientos para la enfermedad metastásica, ningún tratamiento ha mejorado significativamente los resultados en más de 40 años. Claramente, se requieren nuevos enfoques para avanzar en el tratamiento del osteosarcoma metastásico (Luetke A. et al.; *Cancer Treat. Rev.* 40, 523-32; 2014). Grandes consorcios de investigadores en el campo han sugerido que los nuevos avances en el tratamiento del osteosarcoma probablemente no llegarán sin una mejor comprensión de la biología de la metástasis y con el desarrollo de medicamentos con diana en esas rutas (Khanna C. et al; *Clin Cancer Res*; 20(16); 1-10; 2014).

Algunos trabajos previos se refieren a la identificación de los factores de riesgo asociados al resultado clínico en niños con rhabdomioma metastásico (Oberlin O. et al; *Journal of Clinical Oncology*, 2008 May 10; 26(14): 2384-2389) y a los resultados clínicos en niños con rhabdomioma (RMS) y enfermedad metastásica exclusivamente pulmonar (J. *Pediatr. Surg.*, 2005 Jan.; 40(1):256-62).

Una terapia que prevenga la aparición de metástasis pulmonares en niños y adolescentes con osteosarcoma salvaría la vida de más de 70 % de aquellos que actualmente mueren por su enfermedad.

El documento n.º US2017/0165363A1 da a conocer métodos para tratar o prevenir el cáncer en pacientes mediante la administración de inhibidor de la interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8), en un intervalo de proporciones de concentración para inhibir la migración de las células de cáncer. Los compuestos se someten a ensayo en células de fibrosarcoma (HT1080WT).

La interleuquina-8 (IL-8; CXCL8) se considera un mediador principal del reclutamiento de los neutrófilos polimorfonucleares (NPM) y participa en varias patologías, incluyendo la psoriasis, la artritis reumatoide, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la lesión por reperusión en órganos trasplantados (Griffin et al, *Arch Dermatol* 1988, 124: 216; Fincham et al, *J Immunol* 1988, 140: 4294; Takematsu et al, *Arch Dermatol* 1993, 129: 74; Liu *et al*, 1997, 100:1256; Jeffery, *Thorax* 1998, 53: 129; Pesci et al, *Eur Respir J.* 1998, 12: 380; Lafer et al, *Br J Pharmacol.* 1991, 103: 1153; Romson et al, *Circulation* 1993, 67: 1016; Welbourn et al, *Br J Surg.* 1991, 78: 651; Sekido et al, *Nature* 1993, 365, 654). La actividad biológica de IL-8 está mediada por la interacción con dos receptores: CXCR1 y CXCR2, que pertenecen a la familia 7TM-GPCR y que se expresan sobre la superficie de los NPM humanos. Mientras que CXCR1 es selectivo, se une con alta afinidad solo a dos quimioquinas: CXCL6 e IL-8, y muestra una afinidad mucho mayor para IL-8 (Wolf et al, *Eur J Immunol* 1998, 28: 164), el CXCR2 humano es un receptor más promiscuo, que se une a una serie de diferentes citoquinas y quimioquinas. Por lo tanto, CXCR2 actúa como mediador en la actividad de una serie de diferentes moléculas biológicas.

La interleuquina-6 (IL-6) es una citoquina pleiotrópica con múltiples funciones en la regulación inmunitaria, la inflamación y la oncogénesis. La unión de IL-6 al receptor de IL-6 (IL-6R) induce la homodimerización y el reclutamiento de la glucoproteína 130 (gp130), lo que lleva a la activación de la señalización aguas abajo.

Gp130 es parte de los complejos de señalización de receptores para como mínimo 8 citoquinas (IL-6, IL-11, IL-27, LIF, CNTF, OSM, CT-1 y CLC). La unión del ligando induce la asociación de gp130 con una cadena de receptor-a específica para citoquinas, seguida de la activación de cascadas de señalización aguas abajo que incluyen las rutas de JAK/STAT, RAS/RAF/MAPK y PI3K/AKT. Se ha mostrado que la fosforilación de gp130 en Ser782 reduce la expresión en superficie celular de gp130. Como un receptor expresado de manera ubicua, gp130 participa en una amplia gama de procesos biológicos importantes, incluyendo la inflamación, la autoinmunidad, el cáncer, el mantenimiento de células madre y el desarrollo embrionario (Mol Cancer Ther; 12(6); 937-49; 2013).

#### Descripción resumida de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones no comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forman parte de la invención. Cualesquiera referencias en la descripción a métodos de tratamiento se refieren a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para la utilización en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

Los presentes inventores inesperadamente han encontrado que la inhibición de IL-8 puede reducir o prevenir la aparición de metástasis pulmonares asociadas a osteosarcoma, sarcoma de Ewing o rhabdomyosarcoma. En particular, la combinación de un inhibidor de IL-8 con un inhibidor de IL-6 resulta más eficaz.

Los presentes inventores inesperadamente también han encontrado que un inhibidor de IL-8 resulta útil en la prevención y/o el tratamiento del tumor primario de osteosarcoma, sarcoma de Ewing o rhabdomyosarcoma. Preferentemente, cuando el inhibidor de IL-8 se combina con un agente quimioterapéutico.

De acuerdo con lo anterior, un primer objetivo de la presente invención es un producto o kit para la utilización en la prevención y/o el tratamiento de metástasis pulmonares asociadas a osteosarcoma, en donde el producto o kit comprende: A) un inhibidor de IL-8, y B) por lo menos un inhibidor de IL-6 y/o por lo menos un inhibidor de gp130, en donde A) y B) son dos formulaciones separadas para la utilización simultánea, separada o secuencial.

El segundo objetivo de la invención es una composición farmacéutica para la utilización en la prevención y/o tratamiento de metástasis pulmonares asociada a osteosarcoma, que comprende un inhibidor de IL-8 y excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, en donde la composición farmacéutica comprende, además, por lo menos un inhibidor de IL-6 y/o por lo menos un inhibidor de gp130.

#### Descripción de las figuras

- La figura 1 muestra que la expresión de IL6 e IL8 se correlaciona con la eficiencia metastásica y los comportamientos metastásicos en modelos de xenoinjerto de metástasis. Los ratones CB17-SCID inoculados con  $1 \times 10^6$  células OS fueron sacrificados 49 días después de la inoculación. a) La apariencia general de los bloques pulmonares obtenidos de esos ratones sugiere una eficiencia de colonización marcadamente mayor por OS-17 en comparación con las otras líneas celulares. b) Se realizó un recuento de las tinciones H+E de secciones de lóbulos izquierdos incluidos en parafina a fin de cuantificar el número de metástasis por sección. c) La cuantificación reveló un número significativamente mayor de metástasis en las secciones de OS-17 en comparación con OHS. d) La determinación de las concentraciones de IL-6 e IL-8 en los sobrenadantes de 72 horas de cultivos de cada línea celular revela una expresión significativa de ambas citoquinas en las células metastásicas OS-17 en comparación con cualquier línea celular no metastásica. e)-f) Evaluación de la capacidad de respuesta a las señales de IL-6 e IL-8 utilizando un ensayo de migración transpocillo.
- La figura 2 muestra el efecto de DF2156A solo o en combinación con sc144 para reducir las respuestas quimiotácticas al suero en las células OS-17. Las células OS se cultivaron en una membrana de cámara transpocillo y después se transfirieron a una cámara que contenía RPMI con FBS al 2,5 % (control pos.) o RPMI solo (control neg.). Otros pocillos que contenían FBS al 2,5 % en la cámara inferior se trataron con sc144 1  $\mu$ M, DF2156A 10 nM o ambos. Tras 24 horas, se rasparon las cámaras superiores, se tñeron las membranas y se realizó un recuento de las células.
- La figura 3 muestra los efectos de la inhibición de la ruta de IL-6 e IL-8 sobre la colonización pulmonar metastásica. Los ratones inoculados con  $1 \times 10^6$  células OS-17-luc fueron tratados con inhibidores farmacológicos de IL-6 (sc144), IL-8 (DF2156A) o ambos. A) Imágenes bioluminiscentes completadas 28 días después de la inoculación. B) Análisis de supervivencia de los ratones mostrado en A).
- La figura 4 muestra el análisis farmacodinámico (FD) en tejido pulmonar de ratones tratados con DF2156A y sc144. Los ratones tratados con inyecciones de DF2156A o sc144 diariamente fueron sacrificados 24 horas después de su 14<sup>o</sup> dosis del fármaco. Los pulmones extraídos de esos ratones se procesaron utilizando fijación con formalina e inclusión en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés) estándar, después se seccionaron y tñeron inmunohistoquímicamente (IHQ) para pFAK (posterior a IL-8) o pSTAT3 (posterior a IL-6). El bloqueo del receptor redujo la cantidad de activación observada y el número de células infiltrantes, incluso a concentraciones valle.
- La figura 5 muestra el efecto de la combinación DF2156A con sc144 en la prevención de metástasis pulmonares en múltiples modelos de osteosarcoma (OS). Después de la inoculación de células de OS, los ratones recibieron ya sea tratamiento con vehículo o tratamiento tanto con sc144 como con DF2156A durante un período de 42 días.

En el momento en que un ratón de cualquiera de los grupos cumplió con los criterios de valoración, todos los ratones dentro de ese estudio fueron sacrificados, se extrajeron los pulmones y se realizó un recuento de las lesiones metastásicas.

### 5 Descripción detallada de la invención

Tal como se describirá en detalle la sección experimental, los presentes inventores han encontrado que las moléculas que actúan como inhibidores de la actividad de IL-8 presentan eficacia terapéutica en modelos animales de sarcoma. Además, los presentes inventores han encontrado, además, que la inhibición de IL-8 es capaz de contrarrestar la aparición de metástasis pulmonares. En particular, la inhibición combinada de IL-8 e IL-6 previene las metástasis.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, un primer objetivo de la presente invención es un producto o kit para la utilización en la prevención y/o el tratamiento de metástasis pulmonares asociadas a osteosarcoma, en donde el producto o kit comprende: A) un inhibidor de IL-8, y B) por lo menos un inhibidor de IL-6 y/o por lo menos un inhibidor de gp130, en donde A) y B) son dos formulaciones separadas para la utilización simultánea, separada o secuencial.

La expresión "inhibidor de IL-8" según la presente solicitud se refiere a cualquier compuesto capaz de inhibir, parcial o totalmente, la actividad biológica de IL-8. Dicho compuesto puede actuar mediante la reducción de la expresión o actividad de IL-8 o mediante la inhibición de la inducción de la señalización intracelular activada por los receptores de IL-8. Resulta preferente que dicho inhibidor de IL-8 sea capaz de inhibir por lo menos 50 %, preferentemente por lo menos 60 %, de la quimiotaxis inducida por IL-8 en las NPM a una concentración igual o inferior a 500 nM, preferentemente inferior a 100 nM.

Según una realización preferente, el inhibidor de IL-8 de todos los objetivos de la presente invención inhibe la actividad de IL-8 mediada por el receptor CXCR1 o mediada por ambos receptores CXCR1 y CXCR2.

Preferentemente, de acuerdo con la presente realización, dicho inhibidor de IL-8 es ya sea un inhibidor alostérico o un antagonista ortostérico del receptor CXCR1 o de ambos receptores, CXCR1 y CXCR2.

Preferentemente, dicho inhibidor de IL-8 es selectivo para el receptor CXCR1 o es igualmente potente hacia los receptores CXCR1 y CXCR2.

La expresión "selectivo para CXCR1" según la presente invención se refiere a un compuesto que muestra un valor de IC<sub>50</sub> por lo menos 2, preferentemente 3, logaritmos más alto hacia CXCR1 que hacia CXCR2. (Bertini R. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA (2004), 101 (32), pp. 11791-11796).

La expresión "igualmente potente hacia CXCR1 y CXCR2" se refiere a un compuesto que muestra un valor de IC<sub>50</sub> comprendido en el intervalo de entre 10 picomolar (10<sup>-11</sup> M) y 1 micromolar (10<sup>-6</sup> M) hacia CXCR1 y CXCR2. (Bertini R. et al., Br. J. Pharm. (2012), 165, pp. 436-454).

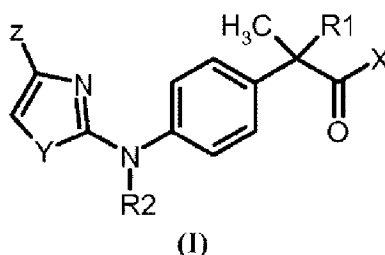
Más preferentemente, el inhibidor de IL-8 según la invención presenta un valor de IC<sub>50</sub> para el receptor CXCR1 en el intervalo nanomolar bajo, preferentemente en el intervalo de 0,02 a 5 nanomolar.

Según una realización preferente, también en combinación con la realización anterior, dicho inhibidor de IL-8 se selecciona de moléculas y anticuerpos de bajo peso molecular, más preferentemente es una molécula de bajo peso molecular.

Los inhibidores de IL-8 según la definición anterior, capaces de inhibir la actividad de IL-8 mediada por el receptor CXCR1 o mediada por ambos receptores CXCR1 y CXCR2, son conocidos de la técnica.

Los inhibidores de IL-8 preferentes según la invención se seleccionan de derivados de ácido 1,3-tiazol-2-ilaminofenilpropanoico, derivados de ácido 2-fenilpropanoico y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Entre los compuestos mencionados, dicho derivado de ácido 1,3-tiazol-2-ilaminofenilpropiónico es preferentemente un compuesto de fórmula (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:

- R<sup>1</sup> es hidrógeno o CH<sub>3</sub>,
- R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal, preferentemente es hidrógeno,
- Y es un heteroátomo seleccionado de S, O y N; preferentemente es S;
- Z se selecciona de halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, hidroxilo, carboxilo, aciloxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, fenoxi, ciano, nitro, amino, acilamino C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, benzoílo, alcano C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-sulfonato lineal o ramificado, alcano C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-sulfonamida lineal o ramificado, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-sulfonilmetilo lineal o ramificado, preferentemente es trifluorometilo,
- X es OH o un residuo de fórmula NHR<sup>3</sup>, en la que R<sup>3</sup> se selecciona de:
  - hidrógeno, hidroxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, o fenilalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en donde el grupo alquilo, cicloalquilo o alqueno puede sustituirse con un residuo COOH,
  - un residuo de fórmula SO<sub>2</sub>R<sup>4</sup>, en la que R<sup>4</sup> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, un cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> y un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

Preferentemente, en los compuestos anteriormente indicados, X es OH.

Entre los compuestos anteriormente indicados, resultan particularmente preferentes los compuestos de dicha fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde:

- R<sup>1</sup> es CH<sub>3</sub>,
- R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal, preferentemente es hidrógeno,
- Y es un heteroátomo seleccionado de S, O y N; preferentemente es S;
- Z se selecciona de halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, hidroxilo, carboxilo, aciloxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, fenoxi, ciano, nitro, amino, acilamino C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, benzoílo, alcano C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-sulfonato lineal o ramificado, alcano C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-sulfonamida lineal o ramificado, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-sulfonilmetilo lineal o ramificado, preferentemente es trifluorometilo,
- X es OH o un residuo de fórmula NHR<sup>3</sup>, en la que R<sup>3</sup> se selecciona de:
  - hidrógeno, hidroxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, o fenilalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en donde el grupo alquilo, cicloalquilo o alqueno puede sustituirse con un residuo COOH,
  - un residuo de fórmula SO<sub>2</sub>R<sup>4</sup>, en la que R<sup>4</sup> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, un cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> y un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

Preferentemente, en estos compuestos X es OH.

Entre los compuestos anteriormente indicados, resultan particularmente preferentes los compuestos de dicha fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde:

- R<sup>1</sup> es hidrógeno,
- R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal, preferentemente es hidrógeno,
- Y es un heteroátomo seleccionado de S, O y N; preferentemente es S;
- Z se selecciona de halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, hidroxilo, carboxilo, aciloxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, fenoxi, ciano, nitro, amino, acilamino C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, benzoílo, alcano C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-sulfonato lineal o ramificado, alcano C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-sulfonamida lineal o ramificado, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-sulfonilmetilo lineal o ramificado, preferentemente se selecciona de trifluorometilo,
- X es OH o un residuo de fórmula NHR<sub>3</sub>; en la que R<sub>3</sub> se selecciona de:
  - hidrógeno, hidroxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, o fenilalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en donde el grupo alquilo, cicloalquilo o alqueno puede sustituirse con un residuo COOH,
  - un residuo de fórmula SO<sub>2</sub>R<sup>4</sup>, en la que R<sup>4</sup> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, un cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> y un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.  
Más preferentemente, X es NH<sub>2</sub>.

Preferentemente, en los compuestos anteriormente indicados, X es OH.

Entre los compuestos anteriormente indicados, resultan particularmente preferentes los compuestos de dicha fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde:

- R<sup>1</sup> es hidrógeno o CH<sub>3</sub>,
- R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal, preferentemente es hidrógeno,
- Y es un heteroátomo seleccionado de S, O y N; preferentemente es S;
- Z se selecciona de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> ramificado o lineal, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; preferentemente se selecciona de metilo, metoxi, trifluorometoxi, trifluorometilo, más preferentemente es trifluorometilo,
- X es OH.

Entre los compuestos anteriormente indicados, resultan particularmente preferentes los compuestos de dicha fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde:

5 R<sup>1</sup> es CH<sub>3</sub>,  
R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal, preferentemente es hidrógeno.

Y es un heteroátomo seleccionado de S, O y N; preferentemente es S.

10 Z se selecciona de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; preferentemente se selecciona de metilo, metoxi, trifluorometoxi, trifluorometilo, más preferentemente es trifluorometilo,

Entre los compuestos anteriormente indicados, resultan particularmente preferentes los compuestos de dicha fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde:

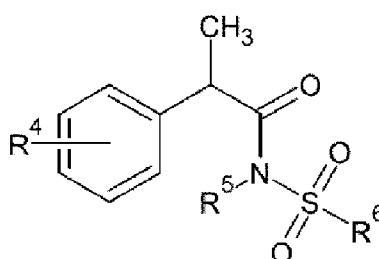
15 R<sup>1</sup> es hidrógeno,  
X es OH,  
R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal, preferentemente es hidrógeno,  
20 Y es un heteroátomo seleccionado de S, O y N; preferentemente es S;  
Z se selecciona de los grupos de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; preferentemente es trifluorometilo.

25 Preferentemente, en todos los compuestos anteriormente indicados de fórmula (I), en la que R<sup>1</sup> es hidrógeno, el átomo de carbono quiral del grupo fenilpropiónico está en la configuración S.

30 Resultan particularmente preferentes los compuestos de fórmula (I) según la invención seleccionados de ácido 2-metil-2-(4-[[4-(trifluorometil)-1,3-tiazol-2-il]amino]fenil)propanoico (también indicado en la presente memoria como DF2726Y) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, preferentemente su sal sódica (en la presente memoria también indicado como DF2726A) y ácido 2-(4-[[4-(trifluorometil)-1,3-tiazol-2-il]amino]fenil)propanoico y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, preferentemente ácido (2S)-2-(4-[[4-(trifluorometil)-1,3-tiazol-2-il]amino]fenil)propanoico (también conocido como DF2755Y) y su sal sódica, también conocida como DF2755A.

35 Se dan a conocer compuestos de fórmula (I) en el documento n.º WO2010/031835, que da a conocer además su método de síntesis, su actividad como inhibidores de IL-8, así como su utilización en el tratamiento de patologías dependientes de IL-8, tales como isquemia cerebral transitoria, penfigoide bulloso, artritis reumatoide, fibrosis idiopática, glomerulonefritis y daños causados por isquemia y reperusión.

40 Entre los inhibidores de IL-8 anteriormente indicados, dicho derivado de ácido 2-fenilpropiónico es preferentemente un compuesto de fórmula (II):



(II)

45 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:  
R<sup>4</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado, benzoilo, fenoxi, trifluorometanosulfoniloxi; preferentemente se selecciona de benzoilo, isobutilo y trifluorometanosulfoniloxi. Además, según una realización preferente, R<sup>4</sup> se encuentra en la posición 3 o 4 en el anillo fenilo, más preferentemente es 3-benzoilo, 4-isobutilo o 4-trifluorometanosulfoniloxi.

R<sup>5</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> lineal o ramificado, preferentemente es H.

50 R<sup>6</sup> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado, o trifluorometilo; preferentemente, es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado, más preferentemente es CH<sub>3</sub>.

Entre los compuestos anteriormente indicados, resultan particularmente preferentes los compuestos de fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde:

R<sup>4</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o benzoílo; preferentemente se encuentra en las posiciones 3 y 4, más preferentemente, es 3-benzoílo o 4-isobutilo.

R<sup>5</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> lineal o ramificado, preferentemente es H,

R<sup>6</sup> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado, o trifluorometilo; preferentemente, es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado, más preferentemente es CH<sub>3</sub>.

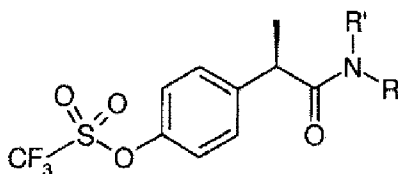
Entre los compuestos anteriormente indicados, resultan preferentes los compuestos de fórmula (II) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde:

R<sup>4</sup> es trifluorometanosulfonilo, preferentemente 4-trifluorometanosulfonilo,

R<sup>5</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> lineal o ramificado, preferentemente es H,

R<sup>6</sup> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado, o trifluorometilo; preferentemente, es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado, más preferentemente es CH<sub>3</sub>.

Entre los compuestos anteriormente indicados, también resultan preferentes los compuestos de fórmula (III):



(III)

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde:

R' es hidrógeno;

R es un residuo de fórmula SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, en la que R<sup>a</sup> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado o haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, preferentemente es CH<sub>3</sub>.

Preferentemente, en el compuesto anteriormente indicado de fórmula (II) o (III), el átomo de carbono quiral del grupo fenilpropiónico está en la configuración R.

Los compuestos particularmente preferentes de fórmula (II) según la invención se seleccionan de R(-)-2-(4-isobutilfenil)propionil metanosulfonamida (también conocida como reparixina) y sales farmacéuticamente aceptables de la misma. Preferentemente, dicho compuesto es la sal de lisina *in situ* de R(-)-2-(4-isobutilfenil)propionilmetansulfonamida (en adelante también indicado como DF1681B).

Los compuestos particularmente preferentes adicionales de fórmula (II) o (III) según la invención son 2-(4-trifluorometanosulfonilo)fenil]-N-metanosulfonilpropionamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, preferentemente su sal sódica, preferentemente R(-)-2-(4-trifluorometanosulfonilo)fenil]-N-metanosulfonilpropionamida (también conocida como DF2156Y) y su sal sódica (también conocida como ladarixina o DF2156A).

Los inhibidores de IL-8 de fórmula (II) y (III) se dan a conocer en los documentos n.º WO0024710 y n.º WO2005/090295, que también dan a conocer su método de síntesis, su actividad como inhibidores de IL-8, así como su utilización como inhibidores de la quimiotaxis y degranulación de neutrófilos inducidos por IL-8 y en el tratamiento de patologías dependientes de IL-8, tales como psoriasis, colitis ulcerosa, melanoma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), penfigoide ampolloso, artritis reumatoide, fibrosis idiopática, glomerulonefritis y daños causados por isquemia y reperfusión.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para conseguir el tratamiento o la prevención de la enfermedad. La determinación de las cantidades eficaces está perfectamente comprendida dentro de las capacidades del experto en la materia, basada en la consecución de un efecto deseado. Una cantidad eficaz dependerá de factores entre los que se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el peso del sujeto y/o el grado de la enfermedad o afección no deseada de la que sufre un sujeto.

Los términos "tratamiento" y "prevención" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a la erradicación/mejoría o prevención/retraso de la aparición, respectivamente, del trastorno que se está tratando o de

uno o más de los síntomas asociados al mismo, sin perjuicio de que el paciente pueda seguir padeciendo el trastorno subyacente.

El segundo objetivo de la presente invención es una composición farmacéutica para la utilización en la prevención y/o el tratamiento de metástasis pulmonares asociada a osteosarcoma, que comprende un inhibidor de IL-8 y excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, en donde la composición farmacéutica comprende, además, por lo menos un inhibidor de IL-6 y/o por lo menos un inhibidor de gp130.

La expresión "inhibidor de IL-6" según la presente solicitud se refiere a cualquier compuesto capaz de inhibir, parcial o totalmente, la actividad biológica de IL-6.

La expresión "inhibidor de gp130" según la presente solicitud se refiere a cualquier compuesto capaz de inhibir, parcial o totalmente, la actividad biológica de gp130.

Según otra realización preferente, dicha composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de las metástasis pulmonares asociadas al osteosarcoma comprende, además, por lo menos un agente quimioterapéutico.

Según una realización preferente, dicho inhibidor de gp130 se selecciona del grupo que comprende hidrazida de ácido 2-(7-fluoropirrol[1,2-a]quinoxalin-4-il)-2-pirazincarboxílico (SC144), raloxifeno y (4R)-3-((2S,3S)-3-hidroxi-2-metil-4-metilenonanoil)-4-isopropildihidrofuran-2(3H)-ona (LMT-28) (Tae-Hwe Heo et al.; Oncotarget, vol. 7, n.º 13, 15460-15473; 2016).

Según una realización preferente, dicho inhibidor de IL-6 se selecciona del grupo que comprende SC144, vobarilizumab, siltuximab, sirukumab, olokizumab, clazakizumab, MAb 1339, tocilizumab y sarilumab (Tae-Hwe Heo et al.; Oncotarget, vol. 7, n.º 13, 15460- 15473; 2016).

Preferentemente, dicho inhibidor de IL-6 es SC144.

Para el propósito de la presente invención, los inhibidores de IL-8 según la presente invención se formulan en composiciones farmacéuticas adecuadas para la utilización mediante formulación oral, tal como tabletas, cápsulas, jarabes, preferentemente en forma de formulaciones de liberación controlada, o mediante administración parenteral, preferentemente en forma de soluciones estériles adecuadas para la administración intravenosa o intramuscular. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, tal como se da a conocer en Remington, "The Science and Practice of Pharmacy", 21st ed. (Lippincott Williams and Wilkins).

La dosis diaria media depende de varios factores, tales como la gravedad de la enfermedad, la condición, la edad, el sexo y el peso del paciente. La dosis variará generalmente entre 1 y 1.500 mg de compuestos de fórmula (I) por día, opcionalmente dividida en múltiples administraciones.

La invención se ilustrará adicionalmente con mayor detalle en la siguiente sección experimental.

## Sección experimental

### Métodos

*Líneas celulares y cultivos celulares primarios.* Se obtuvo la línea OS-17 a partir del xenoinjerto OS-17 de Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna, Italia. Se obtuvieron OS-25 y OHS del laboratorio del Dr. Fodstad en el Hospital Radium de Oslo. Todos fueron mantenidos en RPMI (Corning n.º 10-040-CV) suplementado con FBS al 10 % (Atlanta Biologicals n.º S11150H). Las células 143B y K7M2 se obtuvieron de ATCC (ATCC n.º CRL-8303 y n.º CRL2836) y se cultivaron en DMEM (Corning n.º 10-013-CV) suplementado con FBS al 10 %. OSCA-8 y OSCA-16 fueron proporcionados por Jamie Modiano y la Universidad de Minnesota, y se cultivaron en RPMI con FBS al 10 %. Las células musculares lisas de pulmón (ATCC n.º PCS-130-10) se cultivaron en medio basal para células vasculares (ATCC n.º PCS-100-030) suplementado con el kit de crecimiento de células musculares lisas vasculares (ATCC n.º PCS-100-042). Las células HUVEC (Lonza CC-2517) se cultivaron en medio basal endotelial (Lonza n.º CC-5036) suplementado con EGM-plus SingleQuots (Lonza n.º CC-4542). Los fibroblastos pulmonares humanos (ATCC n.º PCS-201-013) se cultivaron en EMEM (ATCC n.º 30-2003) suplementado con FBS al 10 %. Las células HBEC3-KT (ATCC n.º CRL-4051) se cultivaron en medio basal para células epiteliales de las vías respiratorias (ATCC n.º PCS-300-030) suplementado con el kit de crecimiento de células epiteliales bronquiales (ATCC n.º PCS-300-040). Los macrófagos se derivaron de monocitos aislados a partir de sangre completa (obtenida a través de un protocolo aprobado por el Comité institucional de ética de la investigación (CEI) para la obtención de sangre humana reciente) utilizando un sistema de selección de perlas magnéticas CD14 (Miltenyi n.º 130-050-201) seguido de 72 horas de cultivo en medio libre de suero XVIVO (Lonza n.º 04-380Q) suplementado diariamente con 20 ng/ml de M-CSF humano recombinante (BioLegend n.º 574802). Para los experimentos de cocultivo, se llevaron a cabo cultivos dentro de cada grupo (cocultivo y monocultivos relacionados) utilizando una mezcla 1:1 de los dos medios de cultivo correspondientes para controlar las diferencias en los componentes del medio.

ELISA de IL-6 e IL-8. Se evaluaron los sobrenadantes libres de células de cultivos de 72 horas de cada línea celular realizados en placas de 24 pocillos para determinar las concentraciones de IL-6 e IL-8 utilizando los kits de desarrollo de ELISA DuoSet de I+D (n.º DY206 y n.º DY208), utilizados de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Ensayos de rasguño ("de cicatrización de heridas"). Se sometieron a fragmentación cultivos en monocapa de las líneas celulares OS-17 u OHS, utilizando un Incucyte WoundMaker de Essen (kit de migración celular de Essen n.º 4493). A continuación, se obtuvieron imágenes en serie de pocillos individuales utilizando un Incucyte Zoom de Essen. Se llevó a cabo un análisis y se cuantificó la anchura de las heridas utilizando el Módulo de análisis de migración celular integrado de Essen (Essen n.º 9600-0012).

Ensayos de migración e invasión transpocillo. Se sembraron  $1 \times 10^4$  células OS en insertos de transpocillo (ya sea Falcon n.º 353097 para migración o Corning n.º 354483 para ensayos de invasión de Matrigel) que contenían factores quimiotácticos apropiados. Después de 24 horas de incubación, se drenaron los transpocillos y se raspó la superficie superior de las cámaras/membranas utilizando un hisopo de poliéster. Las membranas se tiñeron utilizando un conjunto de colorantes Dif-Quik (Siemens n.º B4132-1A) y se secaron, después se obtuvieron imágenes con un microscopio invertido. Las células se cuantificaron utilizando las herramientas de recuento de Adobe Photoshop. Para experimentos que involucran la quimiotaxis de IL-6 e IL-8, el medio contenía FBS al 1 % en ambas cámaras, con adición de proteína recombinante a la cámara inferior para preparar IL-6 50 ng/ml (BioLegend n.º 570804) o IL-8 100 ng/ml (BioLegend n.º 574204). Para experimentos que utilizan suero como quimioatrayente, las cámaras superiores contenían solo RPMI, mientras que las cámaras inferiores contenían 1 % o 2,5 % de suero. En donde se indica, se añadieron 20 µg/ml de anticuerpos neutralizantes contra IL6 (Abcam n.º AB6672), IL-8 (Abcam n.º AB18672), o ambos, a las cámaras superior e inferior. En experimentos que someten a ensayo la capacidad de moléculas pequeñas de bloquear la migración/invasión inducida por suero, se añadió sc144 1 µM (Sigma n.º SML0763) y/o DF2156A 100 nM (Dompe Pharmaceuticals, Milán, Italia) al medio.

Proliferación de células de OS. Las células sembradas a una confluencia de 20 % se cultivaron en medio de crecimiento tal como anteriormente, que contenía los inhibidores tal como se indica en cada figura. La proliferación se cuantificó en serie utilizando un Incucyte Zoom de Essen Biosciences durante el período de tiempo indicado en cada figura.

Formación de colonias. Se sembraron  $1 \times 10^4$  células OS en 1,5 ml de agar blando al 0,5 % (Lonza SeaPlaque GTG Agarose, n.º 50111 en RPMI en polvo de Gibco n.º 430-1800) sobre un lecho de 1,5 ml de agar blando al 1 % en placas de 6 pocillos y después se cubrieron con 500 µl de RPMI. En donde se indica, se añadió el fármaco a la capa de RPMI en cantidad suficiente para generar la concentración indicada al difundirse a través de los medios y el agar.

Estudios de supervivencia con xenoinjertos. Los ratones CB17-SCID (Envigo C.B-17/lcrHsd-Prkdcscid) de 6 a 8 semanas de edad inoculados a través de la vena de la cola con  $1 \times 10^6$  células OS-17 (día 0) recibieron inyecciones diarias de sc144 (10 mg/kg s.c. una vez al día, Sigma n.º SML0763), DF2156A (30 mg/kg i.p una vez al día), o ambos a partir de 24 horas después de la inoculación. Se preparó sc144 mediante disolución bajo calentamiento en DMSO para preparar una solución de 40 mg/kg, que se diluyó inmediatamente a 2 mg/kg utilizando propilenglicol al 40 %/Tween-20 al 1 % en agua. Un ratón medio de 20 g recibió 100 µl por dosis. Las dosis de sc144 se prepararon frescas cada día. Se preparó DF2156A mediante disolución en PBS para crear una solución 6 mg/ml para dosis similares de 100 µl en un ratón de 20 g. Los tratamientos continuaron durante 42 días, y después se detuvieron. Se realizó el seguimiento de los ratones mediante pesaje dos veces a la semana y una evaluación mejorada del estado corporal (eBCS, por sus siglas en inglés (28)). Los ratones que mostraron una pérdida de peso >10 % o eBCS <8 fueron sacrificados y se recogieron tejidos, se insuflaron los pulmones, se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 %, y después se incluyeron y trataron tal como se ha indicado anteriormente. Los ratones que no mostraban carga de enfermedad metastásica (que presumiblemente morían por otras causas) fueron excluidos del análisis de supervivencia. Lo anterior incluyó dos ratones que recibieron la terapia combinada, uno que había recibido sc144 y un ratón de control.

Estudios de curso temporal de tratamiento. Los ratones CB17-SCID de 6 a 8 semanas de edad fueron inoculados con  $1 \times 10^6$  células 143B, OSCA-8, OSCA-16 o K7M2 (para las células K7M2, se utilizaron ratones Balb/c inmunocompetentes). Veinticuatro horas después de la inoculación, los ratones comenzaron el tratamiento con sc144 y/o DF2156A a diario, que continuó durante 42 días tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, los ratones se mantuvieron bajo observación tal como se ha mencionado anteriormente hasta que un ratón de cualquier grupo de línea celular alcanzase el criterio de valoración. Si los pulmones extraídos de este ratón centinela mostraron signos de enfermedad metastásica, todos los ratones de ese grupo fueron sacrificados, se recogieron los pulmones, se insuflaron, se fijaron, incluyeron y se tiñeron. Una sección central del lóbulo izquierdo teñida con H+E mediante microscopía fue revisada para realizar un recuento de las lesiones metastásicas por un revisor experimentado y enmascarado al tratamiento. Análisis estadísticos Los datos se representaron gráficamente y se analizaron utilizando Graphpad Prism 7. Los ensayos estadísticos específicos utilizados y las comparaciones realizadas se identifican en el pie de cada figura. En caso necesario, se realizó un ajuste por comparaciones múltiples utilizando el método de Benjamini-Hochberg para controlar la tasa de identificación falsa de 0,05.

## Ejemplo 1

*La producción de IL-6 e IL-8 se correlaciona con el potencial metastásico en modelos de xenoinjerto murino de colonización pulmonar.*

Los presentes inventores sometieron a ensayo un panel de líneas celulares de osteosarcoma para su capacidad para colonizar los pulmones de ratón. Los presentes inventores encontraron que las células OS-17, al introducir las en la circulación a través de la vena de la cola, desarrollaron focos metastásicos con una eficiencia muy alta, mientras que las líneas celulares OHS mostraron una eficiencia metastásica mucho menor (figura 1). Este efecto se mantuvo consistente en múltiples pases de células y en múltiples ensayos. Los presentes inventores sometieron a ensayo dichas líneas celulares para la producción de IL-6 e IL-8 sometiendo sobrenadantes libres de células a ELISA (figura 1d), lo que reveló una fuerte correlación entre la producción por células tumorales de dichas dos citoquinas y la capacidad de la línea celular para colonizar el pulmón murino.

*IL-6 e IL-8 estimulan la quimioquinesis y la migración direccional en células de OS, independientemente del potencial metastásico.*

Para mostrar si estas líneas celulares altamente metastásicas y poco metastásicas mantienen características que responden a estas citoquinas, los presentes inventores llevaron a cabo tanto ensayos de rasguño (ensayos de cicatrización de heridas) como ensayos de migración transpocillo para evaluar la respuesta. Las heridas estandarizadas creadas en monocapas de células OS-17 y OHS se cerraron más eficazmente cuando se cultivaron en medios suplementados con IL-6 y/o IL-8, demostrando que cualquiera de las citoquinas puede estimular la quimioquinesis (incremento de la motilidad celular) en cualquiera de las líneas celulares, independientemente de cualquier producción basal de esa citoquina. Estas células mostraban resultados similares en ensayos que sometían a ensayo la migración direccional. Tanto las células OS-17 como las células OHS en cultivo en la cámara superior de un sistema transpocillo mostraban una fuerte migración direccional en respuesta a los gradientes quimiotácticos de IL-6 o IL-8.

*Efecto de DF2156A solo o en combinación con sc144 en la prevención de la migración direccional e invasión de células de OS*

Para determinar la importancia de dichas citoquinas en la migración de células de OS dentro de un entorno mucho más amplio de posibles factores quimiotácticos, los presentes inventores examinaron el efecto que podría presentar el bloqueo de IL-6 y/o IL-8 al utilizar suero como quimioatrayente. Ambas líneas celulares mostraron una migración e invasión transpocillo muy fuerte a través de una barrera de Matrigel en respuesta a un gradiente quimiotáctico de suero (figura 1e-f). Se puso de manifiesto una cierta disminución en la respuesta quimiotáctica al añadir anticuerpos bloqueadores de IL-6 o IL-8 al medio de cultivo, aunque se observó un efecto mucho más profundo al combinar los anticuerpos. Se observó un efecto más profundo en experimentos similares utilizando inhibidores de molécula pequeña de los receptores de IL-6 e IL-8 (sc144, que estimula la degradación de gp130 a través de un nuevo mecanismo y DF2156A, un inhibidor alostérico de CXCR1 y CXCR2). Con la inhibición a nivel del receptor, el bloqueo de cualquiera de las rutas es suficiente para bloquear la migración e invasión direccionales (figura 2), lo que sugiere que se necesita cierto nivel de activación de estas rutas, probablemente por citoquinas que no son IL-6 e IL-8, para que las células de OS produzcan estos comportamientos. Ambos inhibidores redujeron significativamente el nivel de migración de las células de OS.

## Ejemplo 2

*Efecto de DF2156A solo o en combinación con sc144 en la prevención de metástasis pulmonares*

Para evaluar la importancia funcional de las rutas de IL-6 e IL-8 en la metástasis pulmonar del OS, los presentes inventores utilizaron modelos de xenoinjerto. Los ratones Balb-SCID inoculados a través de la vena de la cola con  $1 \times 10^6$  células OS-17 etiquetadas con luciferasa recibieron tratamiento con sc144 (el inhibidor de gp130), DF2156A (el inhibidor de CXCR1/2) o ambos. Los ratones continuaron recibiendo tratamiento durante 42 días, después de los cuales se detuvo el tratamiento. Se obtuvieron imágenes intravitalas para la evaluación *in vivo* de la carga tumoral los días 14 y 24 utilizando técnicas de bioluminiscencia estándares. Las imágenes bioluminiscentes sugerían una reducción notable de la carga tumoral en los pulmones de los ratones que recibieron terapia combinada en comparación con aquellos que no recibieron ningún tratamiento o que recibieron monoterapia (figura 3 A). Es importante destacar que las pruebas de imagen no mostraron migración de las células tumorales hacia otros órganos, sino una pérdida general de bioluminiscencia, lo que sugiere una reducción de la supervivencia general de las células tumorales circulantes. Se sacrificaron dos ratones de cada grupo de tratamiento con un solo agente 24 horas después de la 14<sup>a</sup> dosis de fármaco para realizar una evaluación de la farmacodinámica (FD) de la inhibición de la diana. Los pulmones de esos ratones teñidos IHQ para pFAK (DF2156A) o pSTAT3 (gp130) mostraron una inhibición sostenida de la diana (es decir, actividad sostenida del fármaco) en el nivel valle de la dosificación (figura 4).

Después del tratamiento, se observaron los ratones hasta que mostraron signos de deterioro clínico, ya sea pérdida de peso >10 % o una puntuación mejorada de estado corporal (eBCS) <8, que fueron los criterios de valoración de los

presentes inventores. En el criterio de valoración, los ratones fueron sacrificados utilizando métodos aprobados y se extrajeron los pulmones, se insuflaron, se fijaron, se incluyeron, se realizaron secciones y se tiñeron. El análisis de supervivencia (figura 3B) mostró que prácticamente todos los ratones que recibieron ya sea ningún fármaco o terapia con un solo agente desarrollaron metástasis pulmonar letal en 60 días. En particular, los ratones que no recibieron ningún fármaco desarrollaron metástasis pulmonares letales antes que los ratones que recibieron un solo agente. Por otro lado, la mayoría de los ratones que recibieron terapia combinada (inhibidor de gp130 + inhibidor de CXCR1/2) se mantuvieron sanos durante más de 100 días. Los ratones que no mostraron metástasis pulmonares evidentes en las secciones pulmonares fueron excluidos del análisis de supervivencia (n=2).

### Ejemplo 3

#### *Efecto de la combinación de DF2156A y sc144 en la prevención de las metástasis pulmonares en múltiples modelos de OS*

Con el fin de garantizar que los resultados obtenidos en estos estudios fueran ampliamente aplicables y no únicos de los xenoinjertos inmunodeficientes o de las células OS-17, los presentes inventores repitieron los experimentos relacionados con el tratamiento utilizando varios modelos diferentes. Entre ellos se incluyeron un modelo singénico e inmunocompetente utilizando una línea celular derivada de un OS de aparición espontánea en un ratón Balb/c (K7M2), modelos de xenoinjerto de OS canino (OSCA-8 y OSCA-16), y modelos adicionales de xenoinjerto de OS humano (143B). Los ratones inoculados con células tumorales fueron tratados ya sea con ningún fármaco o con una combinación de sc144 y DF2156A durante 42 días. En el momento en que por lo menos un ratón de cualquier grupo (cualquier línea celular) alcanzó el criterio de valoración con metástasis pulmonar confirmada, todos los ratones de ese grupo fueron sacrificados, se extrajeron los pulmones y se cuantificaron las lesiones metastásicas. La capacidad de la inhibición dual de gp130-CXCR1/2 para prevenir el desarrollo de lesiones pulmonares metastásicas se mantuvo consistente en todos los modelos (figura 5).

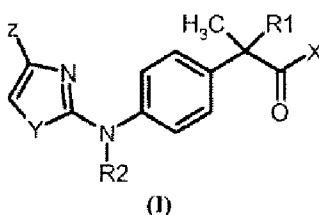
## REIVINDICACIONES

1. Producto o kit para la utilización en la prevención y/o el tratamiento de metástasis pulmonares asociadas a osteosarcoma, en donde el producto o kit comprende:

- A) un inhibidor de IL-8, y  
B) por lo menos un inhibidor de IL-6 y/o por lo menos un inhibidor de gp130,

en donde A) y B) son dos formulaciones separadas para la utilización simultánea, separada o secuencial.

2. Producto o kit para la utilización según la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor de IL-8 es un compuesto de fórmula (I):



en la que:

- R<sup>1</sup> es hidrógeno o CH<sub>3</sub>,
- R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal; preferentemente es hidrógeno,
- Y es un heteroátomo seleccionado de S, O y N; preferentemente es S,
- Z se selecciona de halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, hidroxilo, carboxilo, aciloxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, fenoxi, ciano, nitro, amino, acilamino C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, benzoílo, alcano C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-sulfonato lineal o ramificado, alcano C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-sulfonamida lineal o ramificada, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-sulfonilmetilo lineal o ramificado; preferentemente es trifluorometilo,
- X es OH o un residuo de fórmula NHR<sup>3</sup>, en la que R<sup>3</sup> se selecciona de:

- hidrógeno, hidroxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, o fenilalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en donde el grupo alquilo, cicloalquilo o alquenilo puede sustituirse con un residuo COOH,
- un residuo de fórmula SO<sub>2</sub>R<sup>4</sup>, en la que R<sup>4</sup> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, un cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> o un haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

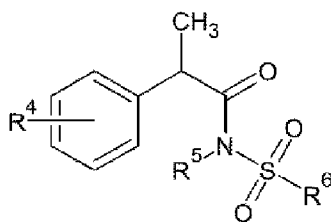
3. Producto o kit para la utilización según la reivindicación 2, en el que dicho inhibidor de IL-8 de fórmula (I):

- R<sup>1</sup> es hidrógeno o CH<sub>3</sub>,
- X es OH,
- R<sup>2</sup> es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal,
- Y es un heteroátomo seleccionado de S, O y N,
- Z se selecciona de grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y haloalcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

4. Producto o kit para la utilización según la reivindicación 2, en el que el inhibidor de IL-8 de la fórmula (I), R<sup>1</sup> es hidrógeno y el átomo de carbono quiral del grupo fenilpropiónico está en la configuración S.

5. Producto o kit para la utilización según la reivindicación 2 o 3, en el que dicho inhibidor de IL-8 de fórmula (I) se selecciona de ácido 2-metil-2-(4-[[4-(trifluorometil)-1,3-tiazol-2-il]amino]fenil)propanoico y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, preferentemente su sal sódica, y el ácido (2S)-2-(4-[[4-(trifluorometil)-1,3-tiazol-2-il]amino]fenil)propanoico y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, preferentemente su sal sódica.

6. Producto o kit para la utilización según la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor de IL-8 es un compuesto de fórmula (II):

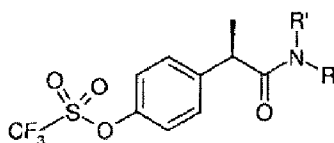


(II)

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,  
en la que:

R<sup>4</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado, benzoílo, fenoxi, trifluorometanosulfonyloxi, preferentemente se selecciona de benzoílo, isobutilo y trifluorometanosulfonyloxi, R<sup>5</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> lineal o ramificado, preferentemente es H, R<sup>6</sup> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado, o trifluorometilo; preferentemente, es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado, más preferentemente es CH<sub>3</sub>.

7. Producto o kit para la utilización según la reivindicación 6, en el que R<sup>4</sup> está en la posición 3 o 4 en el anillo fenilo, más preferentemente es 3-benzoílo, 4-isobutilo o 4-trifluorometanosulfonyloxi.
8. Producto o kit para la utilización según la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor de IL-8 es un compuesto de fórmula (III):



(III)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  
en donde:

R' es hidrógeno;

R es un residuo de fórmula SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, en la que R<sup>a</sup> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado o haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; preferentemente es CH<sub>3</sub>.

9. Producto o kit para la utilización según la reivindicación 6, en el que dicho inhibidor de IL-8 de fórmula (II), el átomo de carbono quiral del grupo fenilpropiónico está en la configuración R.
10. Producto o kit para la utilización según la reivindicación 6, en el que dicho inhibidor de IL-8 de fórmula (II) se selecciona de R(-)-2-(4-isobutilfenil)propionilmetanosulfonamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, preferentemente la sal de lisina *in situ*.
11. Producto o kit para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que dicho inhibidor de IL-8 es la R(-)-2-(4-trifluorometanosulfonyloxi)fenil]-N-metanosulfonylpropionamida y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, preferentemente su sal sódica.
12. Producto o kit para la utilización según la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor o inhibidores de gp130 se seleccionan del grupo que comprende hidrazida de ácido 2-(7-fluoropirrol[1,2-a]quinoxalín-4-il)-2-pirazincarboxílico, raloxifeno y (4R)-3-((2S,3S)-3-hidroxi-2-metil-4-metilenononanoíl)-4-isopropildihidrofuran-2(3H)-ona.
13. Producto o kit para la utilización según la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor o inhibidores de IL-6 se seleccionan del grupo que comprende SC144, vobarilizumab, siltuximab, sirukumab, olokizumab, clazakizumab, MAb 1339, tocilizumab y sarilumab.
14. Composición farmacéutica para la utilización en la prevención y/o el tratamiento de metástasis pulmonares asociadas a osteosarcoma, que comprende un inhibidor de IL-8 y excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, en donde la composición farmacéutica comprende, además, por lo menos un inhibidor de IL-6 y/o por lo menos un inhibidor de gp130.

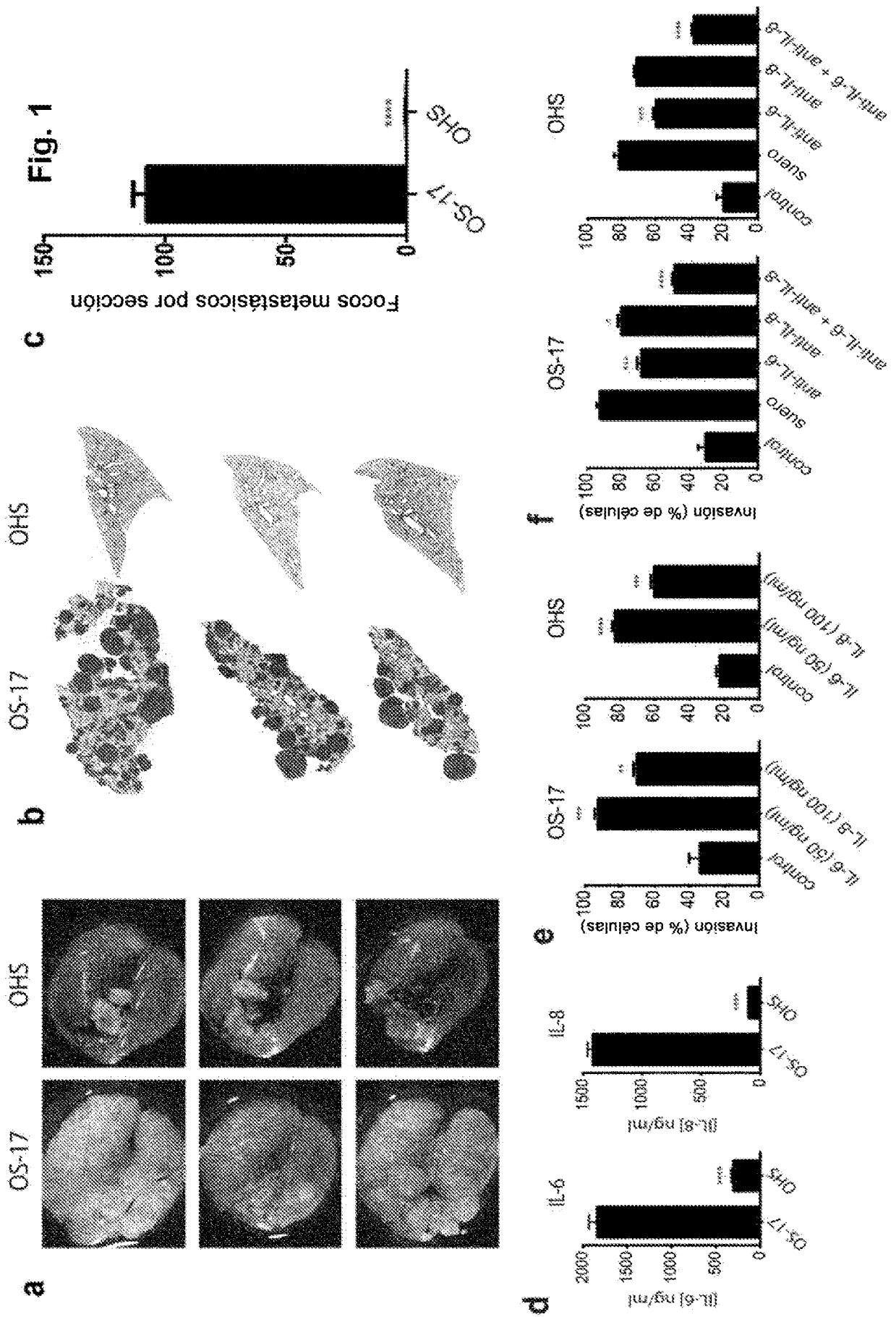
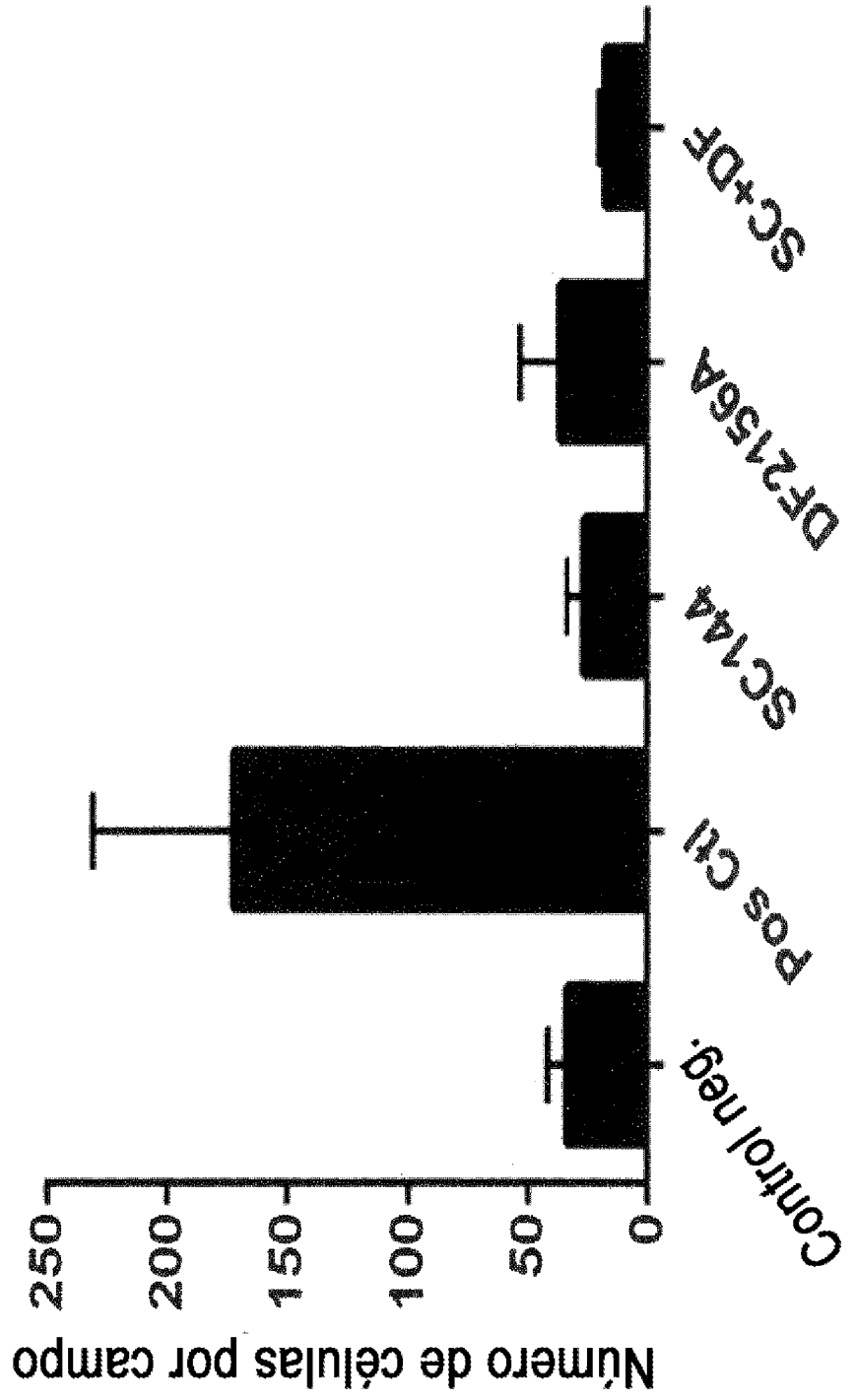
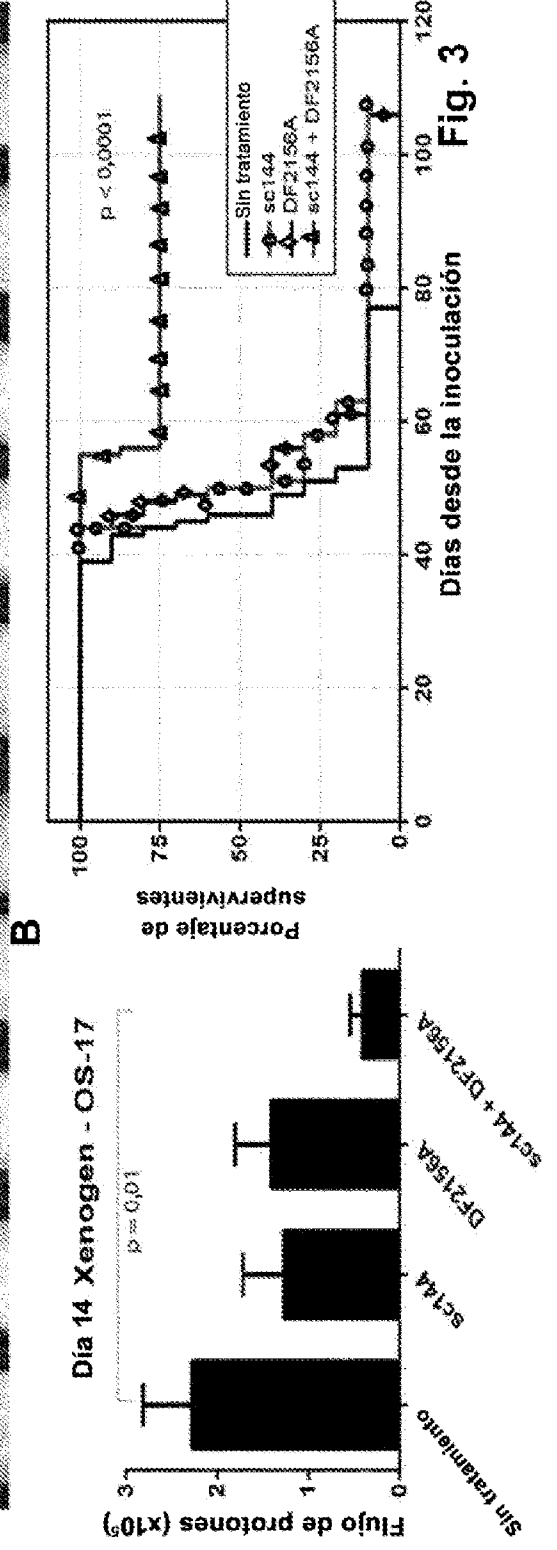
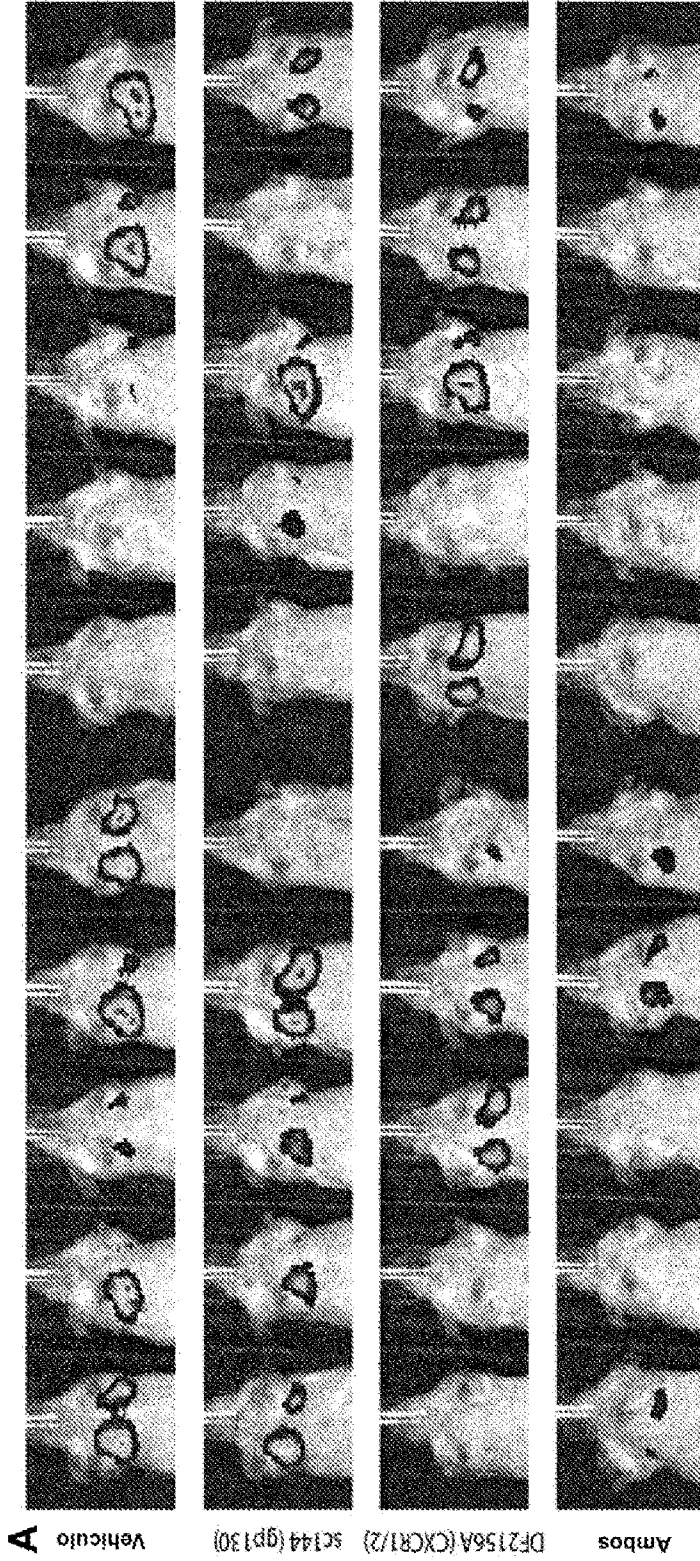


Fig. 2

### Transpocillo con OS17, con suero e inhibidores





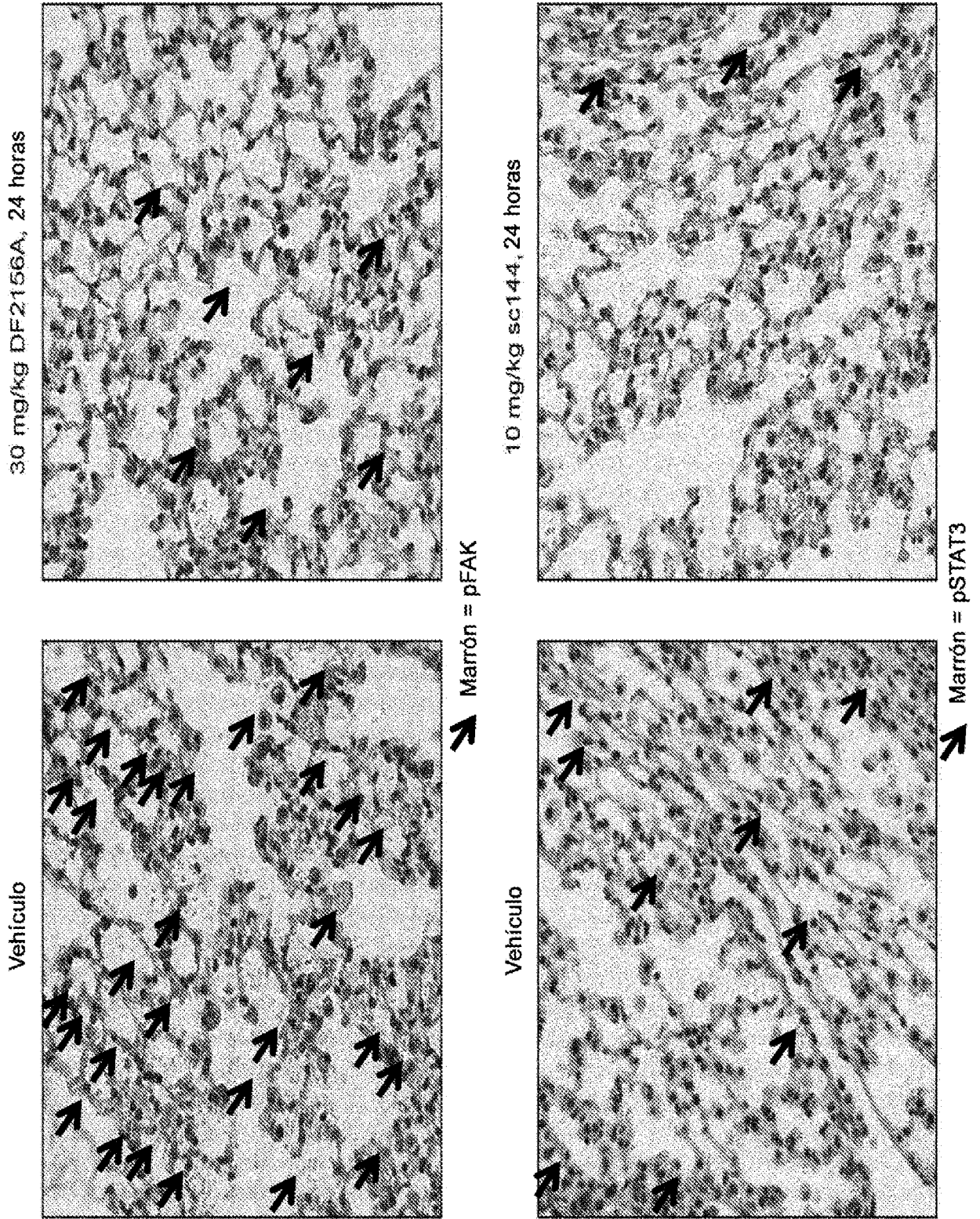


Fig. 4

Fig. 5

