

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 961**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 31/192** (2006.01)

**A61K 31/44** (2006.01)

**A61K 31/64** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2017** **E 17809396 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019** **EP 3344296**

54 Título: **Uso de antagonistas del receptor EP4 para su uso en el tratamiento de cáncer de hígado asociado a NASH**

30 Prioridad:

**04.11.2016 US 201615343999**

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

**07.11.2019**

73 Titular/es:

**ASKAT INC. (100.0%)  
3-22-8 Meieki, Nakamura-ku, Nagoya-shi  
Aichi 450-002, JP**

72 Inventor/es:

**OHTANI, NAKO;  
KAMACHI, FUMITAKA;  
LOO, TZE MUN;  
KOIZUMI, SHINICHI y  
OKUMURA, TAKAKO**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 729 961 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

Uso de antagonistas del receptor EP4 para su uso en el tratamiento de cáncer de hígado asociado a NASH

## 5 {Campo Técnico}

La presente invención se refiere a un antagonista del receptor 4 de la prostaglandina E2 (EP4) para su uso en un método para el tratamiento del cáncer de hígado asociado a la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). El método para el tratamiento del cáncer de hígado asociado a NASH comprende administrar uno cualquiera de ácido 4-[(1S)-1-([5-cloro-2-(3-fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil)amino]etil]-benzoico (a partir de ahora en el presente documento, "Compuesto A"), ácido 4-((1S)-1-[5-cloro-2-(4-fluorofenoxi)benzoil]amino)etil]benzoico (a partir de ahora en el presente documento, "Compuesto B") o 3-[2-(4-{2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il}fenil)etil]-1-[(4-metilbenceno)sulfonil]urea (a partir de ahora en el presente documento, "Compuesto C"), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, como el antagonista de EP4 (a partir de ahora en el presente documento, "los compuestos de la invención"), o una composición farmacéutica que comprende los compuestos de la invención a un ser humano o un animal. El método de tratamiento incluye administrar los compuestos de la invención solos o junto con uno o más principios activos y/o terapias al ser humano o animal que tiene un cáncer de hígado asociado a NASH. El método de tratamiento incluye también una terapia que regula las funciones específicas de las células inmunitarias y/o sus distribuciones en el tejido tumoral del cáncer de hígado asociado a NASH mediante los antagonistas de EP4, que incluyen los compuestos de la invención. Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende los compuestos de la invención o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para su uso en un método para el tratamiento del cáncer de hígado asociado a NASH. A partir de ahora en el presente documento, los "compuestos de la invención" incluyen uno cualquiera del Compuesto A, Compuesto B y Compuesto C, cada uno de ellos solo o en combinación, o una sal farmacéuticamente aceptable de uno cualquiera de estos compuestos.

25

## {Antecedentes de la técnica}

La enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD) es la causa más habitual de enfermedad hepática crónica en Estados Unidos, con una prevalencia estimada del 30 a 40 % de la población adulta. Aunque se considera que solo de 5 al 20 % de los pacientes de NAFLD cumplen los criterios histopatológicos de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), esto sigue traduciendo en una prevalencia nacional del 2 al 5 % de la población que tiene un mayor riesgo de progresión de la cirrosis. La propia cirrosis es un factor de riesgo suficiente de cáncer de hígado incluido el carcinoma hepatocelular (HCC). La obesidad también parece contribuir al riesgo de desarrollar HCC según un metaanálisis de estudios de cohorte que muestran un aumento del riesgo del 90 % de HCC en pacientes obesos. Esto puede explicar parcialmente las tasas crecientes de HCC en los países desarrollados y el aumento del 80 % en la incidencia anual del HCC en Estados Unidos en la dos últimas décadas (NPL 1: Torres et al., Semin Liver Dis., 2012, 32(1): 30-38).

Incluso más alarmante es el hecho que se ha demostrado que el HCC se produce en pacientes que tienen NASH no cirrótica. Acumulativamente, estos datos proporcionan una evidencia sólida de que el HCC se puede producir más en pacientes de NASH no cirróticos que en pacientes de NASH cirróticos, aunque se necesitan estudios de prospectiva más grandes para obtener tasas de incidencia. El vínculo entre la NASH y el cáncer de hígado está bien establecido. Estudios de gran número de casos han demostrado un fenotipo específico en pacientes ancianos predominantemente varones con síndrome metabólico previamente existente que pueden desarrollar HCC son antecedentes de cirrosis. Se han descrito algunos de los supuestos complejos mecanismos patofisiológicos que conducen a esto, pero sigue en desarrollo una comprensión completa de la interrelación y solapamiento entre el fomento por NASH y los procesos oncogénicos (NPL 1).

Las causas principales de la hepatitis y el se pueden dividir en las dos categorías siguientes: (1) infecciones por los virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC) y (2) causas metabólicas, tales como el consumo de alcohol y la NAFLD. En general, la hepatitis crónica mediada por infección vírica es la causa más habitual de la hepatitis, seguido por enfermedades hepáticas alcohólicas y la NAFLD. La farmacoterapia de la hepatitis mediada por infección vírica es algo ya establecido y la terapia con antivirales que utiliza interferón alfa y análogos de nucleótidos se prescribe de forma habitual. Por otro lado, la farmacoterapia del NAFLD, NASH y enfermedades asociadas con el cáncer de hígado no se han establecido ya que la propia enfermedad se ha reconocido solo recientemente.

La obesidad se ha convertido en un problema de salud mundial y se sabe que aumenta el riesgo de diabetes, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Entre los cánceres asociados con la obesidad, se ha mostrado que el cáncer de hígado tiene un vínculo sólido con la obesidad, según estudios epidemiológicos (NPL 2: Bhaskaran et al., Lancet, 2014, 384: 755-765; NPL 3: Calle y Kaaks, Nature Reviews Cancer, 2004, 4: 579-591; y NPL 4: Calle et al., New England J. Med., 2003, 348(17): 1625-1638). El factor de riesgo más importante del HCC es la infección a largo plazo por VHB o VHC (NPL 5: El-Serag, New England J. Med., 2011, 365: 1118-1127; y NPL 6: Marengo et al., Annual Review of Medicine, 2016, 67: 103-117). Sin embargo, la NAFLD y la NASH asociadas a la obesidad han aparecido recientemente como factores de riesgo del cáncer de hígado (NPL 6; NPL 7: Michelotti et al., Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol., 2013, 10: 656-665; y NPL 8: Streba et al., World J. Gastroenterology, 2015, 21(14): 4103-4110). Actualmente no existe terapia para la NAFLD, NASH y cáncer de hígado asociado a NASH. Por tanto,

existe una necesidad urgente de desarrollar una terapia para el cáncer de hígado asociado a NASH.

Las prostaglandinas son mediadores del dolor, fiebre, y otros síntomas asociados con la inflamación. La prostaglandina E2 (PGE2) es el eicosanoide predominante expresado en dolencias inflamatorias. La PGE2 también está implicada en diversas dolencias fisiológicas y/o patológicas, tales como la hiperalgesia, contracción uterina, peristalsia digestiva, vigilia, supresión de la secreción de ácido gástrico, tensión arterial, función plaquetaria, metabolismo óseo, angiogénesis y crecimiento de células cancerosas, invasión y metástasis, o similares. Las referencias no de patente divulgan el carácter de los receptores prostanoides, su relación con la terapia, y los agonistas y antagonistas selectivos más generalmente utilizados (véase, por ejemplo, NPL 9: Konya et al., *Pharmacology & Therapeutics*, 2013, 138: 485-502; y NPL 10: Yokoyama et al., *Pharmacol. Rev.*, 2013, 65: 1010-1052).

Se ha notificado que PGE2 está intensamente expresado en tejidos cancerosos de varios tipos de cánceres, y también se ha demostrado que la PGE2 está correlacionada con el inicio, crecimiento y desarrollo de cáncer y patologías de pacientes. Se acepta de una forma general que la PGE2 está relacionada con la activación de la proliferación y la muerte celular (apoptosis) y tiene un papel importante en los procesos de proliferación de las células cancerosas, progresión de la enfermedad y metástasis del cáncer (véase, por ejemplo, NPL 9; y NPL 10).

Existen cuatro subtipos de receptores de PGE2, EP1, EP2, EP3 y EP4, que presentan diferentes propiedades farmacológicas. El subtipo de receptor EP4 pertenece a la subfamilia de receptores acoplados a la proteína G, conocido como un receptor con siete dominios transmembrana. En consecuencia, EP4 tiene un papel significativo en eventos biológicos por estimulación de las funciones mediadas por la señal de AMPc. Desde el punto de vista de los estudios farmacológicos, se ha llevado a cabo una investigación de compuestos con actividades antagonistas de los receptores de EP4, y se conocen antagonistas selectivos del receptor de EP4 (NPL 9).

Respecto al papel del receptor de EP4 en el cáncer, cierta bibliografía no de patente (por ejemplo, NPL 10; y NPL 11: Ma et al., *Oncoimmunology*, 2013, 2(1): e22647) y bibliografía de patentes (PTL 1: patente de Estados Unidos n.º 8.921.391 B2) demuestran inhibiciones del crecimiento: y/o metástasis del cáncer de colon, mama, gástrico, pulmón, próstata, y otros tipos de cáncer en modelos de tumores en animales que utilizan antagonistas del receptor de EP4. Alguna bibliografía de patentes (por ejemplo PTL 2: documento WO2015/179615 A1 y PTL 3: documento US2015/0004175 A1) muestran el efecto terapéutico de un antagonista del receptor EP4 o la inhibición de los resultados de la señalización de EP4 sobre la inhibición del crecimiento tumoral. Además, la inhibición de la señalización de EP4 junto con otras terapias contra el cáncer o radioterapia muestran beneficios adicionales en comparación con cada una de las monoterapias (véase PTL 2).

El papel del receptor de EP4 receptor en el cáncer de hígado se ha notificado recientemente en la bibliografía no de patentes. La señalización del receptor PGE2/EP4 mediante la activación de PKA/CREB regula en exceso la expresión de c-Myc y da como resultado un fomento del crecimiento celular en células HCC *in vitro* (NPL 12: Xia et al., *Oncology Reports*, 2014, 32: 1521-1530). PGE2 también fomentó una acumulación de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) inducida por células estrelladas hepáticas en experimentos *in vitro* e *in vivo* que supuestamente estimulaba el crecimiento de células cancerosas (NPL 13: Xu et al., *Oncotarget*, 2016, 7(8): 8866-8878). Esta bibliografía indica que la señalización de PGE2/EP4 puede tener ciertos papeles en el cáncer de hígado. Sin embargo, estas referencias no demuestran la supresión del cáncer de hígado mediante la inhibición de la señalización de PGE2/EP4 en animales. La supresión de señalización del receptor PGE2/EP4 (o junto con un anticuerpo de PD-1) restaura la actividad funcional de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (CTL) (NPL 14: Chen et al., *Nature Medicine*, 2015, 21(4):327-334; y PTL 3). Estas referencias demuestran que la inhibición de la señal de EP4 media la activación de la actividad CTL de un hospedador, pero no hay evidencia directa de que la inhibición de la señal de EP4 o que la actividad agonística de EP4 tenga eficacia sobre el crecimiento del HCC y/o la metástasis.

La patente de Estados Unidos n.º 8.921.391 B2 (PTL 1) demuestra las eficacias antitumorales del Compuesto A, B, y/o C en cáncer gástrico, pulmón, próstata, y otros tipos de cáncer en modelos de tumores en animales. En esta patente, no se proporcionan ejemplos experimentales relativos al cáncer de hígado, ni aparece el cáncer de hígado en ninguna de las reivindicaciones. Además, esta patente no divulga el tratamiento de cáncer hepático "asociado a la esteatohepatitis no alcohólica (NASH)" ni divulga ninguna información relacionada con la NASH ni la NAFLD.

En 2015, se notificó una afectación crítica relacionada con la inhibición de la señalización de PGE2/EP4 en la terapia del cáncer, específicamente en enfermedades crónicas relacionadas con la infección vírica, tales como las enfermedades hepáticas mediadas por VHB y VHC. La inhibición de la señalización de PGE2/EP4 produce una inducción o activación significativa de la expresión de PD-1 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> (CTL) específicos en un modelo animal (NPL 14). El aumento de la expresión de PD-1 en los CTL sugiere de forma sólida una supresión de la función inmunitaria clave mediada por los linfocitos T contra la infección. En el caso de cánceres de hígado con infección crónica por VHB y VHC, el aumento de la expresión de PD-1 en los CTL debería por tanto producir una estimulación de la expansión vírica y también del desarrollo y crecimiento tumoral. El impacto del aumento de la expresión de PD-1 sobre los CTL en el crecimiento y desarrollo tumoral se demostró claramente mediante la eficacia fundamental de sus inhibidores (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra PD-1 o un inhibidor del punto de control inmunitario) en reciente terapia clínica contra el cáncer. En consecuencia, esta investigación produjo una preocupación general sobre el riesgo de aumentar el crecimiento tumoral mediante la inhibición de la señalización de PGE2/EP4 durante el

tratamiento del cáncer de hígado (NPL 14). Por consiguiente, se esperaba que la inhibición de la señalización de PGE2/EP4 activara la expresión de PD-1, lo que suprimiría la respuesta inmunitaria contra una infección vírica, y posteriormente estimularía el desarrollo del virus y el desarrollo del cáncer de hígado.

5 A la vista de esta afectación negativa acerca de la inhibición de la señalización de EP4 en la terapia del cáncer de hígado, los presentes inventores han descubierto inesperadamente efectos antitumorales y supresión de la expresión de PD-1 significativos sobre linfocitos T CD8<sup>+</sup> (CTL) en el cáncer de hígado asociado a NASH. Esto contradice los resultados de la expresión de PD-1 en un modelo de cáncer de hígado asociado a virus para un antagonista de EP4 en monoterapia y junto con otro fármaco en un modelo animal. El cáncer de hígado asociado a NASH tiene causas diferentes al cáncer de hígado asociado a infección vírica. Hasta ahora, no había evidencia que soportara el mecanismo de EP4, incluida la actividad antagonista de EP4, en una terapia para tratar el cáncer de hígado asociado a NASH. Además, no se han divulgado evidencias en la técnica relativas a la eficacia de una terapia de combinación del receptor de EP4 con ninguna otra terapia en el tratamiento del cáncer de hígado asociado a NASH. En consecuencia, el uso de un antagonista de EP4 en el cáncer de hígado asociado a NASH era algo inesperado en la técnica.

### {Lista de citas}

[Bibliografía de patentes]

20 {PTL 1} Patente de los Estados Unidos n.º 8.921.391 B2  
 {PTL 2} Documento WO 2015/179615  
 {PTL 3} Documento US 2015/0004175 A1

25 {Bibliografía no de patente}

{NPL 1} Torres et al., *Semin Liver Dis.*, 2012, 32(1): 30-38  
 {NPL 2} Bhaskaran et al., *Lancet*, 2014, 384: 755-765  
 {NPL 3} Calle y Kaaks, *Nature Reviews Cancer*, 2004, 4: 579-591  
 30 {NPL 4} Calle et al., *New England J. Med.*, 2003, 348(17): 1625-1638  
 {NPL 5} El-Serag, *New England J. Med.*, 2011, 365: 1118-1127  
 {NPL 6} Marengo et al., *Annual Review of Medicine*, 2016, 67:103-117  
 {NPL 7} Michelotti et al., *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2013, 10: 656-665  
 {NPL 8} Strebba et al., *World J. Gastroenterology*, 2015, 21(14): 4103-4110  
 35 {NPL 9} Konya et al., *Pharmacology & Therapeutics*, 2013, 138: 485-502  
 {NPL 10} Yokoyama et al., *Pharmacol. Rev.*, 2013, 65: 1010-1052  
 {NPL 11} Ma et al., *Oncoimmunology*, 2013, 2(1): e22647  
 {NPL 12} Xia et al., *Oncology Reports*, 2014, 32:1521-1530  
 {NPL 13} Xu et al., *Oncotarget*, 2016, 7(8): 8866-8878  
 40 {NPL 14} Chen et al., *Nature Medicine*, 2015, 21(4): 327-334  
 {NPL 15} Ohtani et al., *Cancer Research*, 2014, 74: 1885-1889  
 {NPL 16} Fuertes et al., *J. Exp. Med.*, 2011, 208: 2005-2016  
 {NPL 17} Salmon et al., *Immunity*, 2016, 44: 924-938  
 45 {NPL 18} Zelenay et al., *Cell*, 2015, 162: 1257-1270

### {Sumario de la invención}

#### {Problema técnico}

50 Como se analiza anteriormente, la obesidad se ha convertido en un problema de salud mundial y se sabe que aumenta el riesgo de algunos tipos de cáncer. El cáncer de hígado asociado a la obesidad tiene factores de riesgo causativos que son diferentes del HCC mediado por una infección a largo plazo por VHB o VHC. Se ha mostrado que el cáncer de hígado tiene un vínculo sólido con la obesidad, según estudios epidemiológicos. Además, la NAFLD y la NASH asociadas a la obesidad han aparecido recientemente como factores de riesgo del cáncer de hígado. Como resultado, se necesitan mecanismos moleculares precisos que medien en el desarrollo del cáncer de hígado asociado a la obesidad y/o la NASH así como compuestos terapéuticos para estas enfermedades. Se esperaba que el tratamiento del cáncer de hígado con infección crónica por VHB y VHC mediante la inhibición de la señal de PGE2/EP4 aumentara el diagnóstico del cáncer de hígado por aumento de la expresión de D-1 sobre CTL. Como resultado, había preocupación por el tratamiento de los cánceres de hígado, no solamente el cáncer de hígado con infección vírica crónica, sino también del cáncer de hígado asociado a enfermedades alcohólicas, NAFLD, y NASH con la inhibición de la señalización de EP4.

#### {Solución al problema}

65 El fin de la presente invención es proporcionar un método para el tratamiento del cáncer de hígado asociado a NASH usando un antagonista del receptor de EP4 tanto solo como junto con compuestos terapéuticos disponibles. Para

conseguir este objetivo, los presentes inventores han descubierto que cada uno de los tres siguientes compuestos y las sales farmacéuticamente aceptable de los mismos, disminuyen de forma muy importante el crecimiento y el desarrollo del cáncer de hígado asociado a NASH inducido por obesidad en un modelo de ratón validado:

- 5            ácido 4-[(1S)-1-[[5-cloro-2-(3-fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil]amino]etil]benzoico (Compuesto A),  
 ácido 4-((1 S)-1-[[5-cloro-2-(4-fluorofenoxi)benzoil]amino]etil]benzoico (Compuesto B), y  
 3-[2-(4-{2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il})fenil]etil]-1-[(4-metilbenceno)sulfonil]urea (Compuesto C).

10            En consecuencia, la presente invención está basada en el descubrimiento de que los compuestos de la invención  
 tienen actividad antagonista de EP4 selectiva e inhiben el crecimiento y el desarrollo del cáncer de hígado asociado a  
 NASH inducido por obesidad en un modelo de ratón. Este es el primer descubrimiento en el mundo de que un  
 antagonista de EP4 tiene eficacia terapéutica contra el cáncer de hígado asociado a NASH inducido por obesidad.  
 Además, los inventores han descubierto que el tratamiento del cáncer de hígado asociado a NASH con un antagonista  
 de EP4 junto con un anticuerpo de PD-1 muestra un efecto sinérgico o mayor eficacia en comparación con el  
 15            tratamiento con monoterapia de cada fármaco.

Específicamente, la presente invención es como se indica a continuación:

20            [1] Un antagonista de EP4 para uso en un método para el tratamiento del cáncer de hígado asociado a NASH que  
 comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz del antagonista de EP4 a un ser humano o un  
 animal que lo necesita.

[2] El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con el punto [1], que comprende además administrar la cantidad  
 farmacéuticamente eficaz del antagonista de EP4 junto con un segundo principio activo, una terapia antitumoral, o  
 ambos.

25            [3] El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con el punto [2], en el que el segundo principio activo es un  
 inhibidor del punto de control inmunitario o un inhibidor de PD-1.

[4] El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [3], en el que el  
 antagonistas de EP4 es al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: ácido 4-[(1S)-1-[[5-  
 30            cloro-2-(3-fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil]amino]etil]benzoico (Compuesto A), ácido 4-((1S)-1-[[5-cloro-2-(4-  
 fluorofenoxi)benzoil]amino]etil]benzoico (Compuesto B), y 3-[2-(4-{2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-  
 il})fenil]etil]-1-[(4-metilbenceno)sulfonil]urea (Compuesto C),  
 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[5] Un antagonista de EP4 para su uso en un método o terapia, que se selecciona entre uno o más del grupo que  
 35            consiste en:

un aumento de las DC, las DC CD103<sup>+</sup>, que pueden activar la función inmunitaria antitumoral en un ser humano  
 o animal que lo necesita,

disminuir linfocitos Treg Foxp3<sup>+</sup> que suprimen la función inmunitaria antitumoral en un ser humano o animal  
 que lo necesita,

40            aumentar la proporción de linfocitos T CD8<sup>+</sup>/T reguladores en un ser humano o animal que lo necesita,  
 aumentar la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados (células CD69<sup>+</sup>) en un ser humano o en un animal que  
 lo necesita, y

disminuir la expresión de PD-1 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> en un ser humano o en un animal que lo necesita, y

45            en el que el método comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz del antagonista de EP4  
 para el tratamiento del cáncer de hígado asociado a NASH a un ser humano o animal que lo necesita.

[6] El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con el punto [5], que comprende además administrar la cantidad  
 farmacéuticamente eficaz del antagonista de EP4 junto con un segundo principio activo, una terapia antitumoral, o  
 50            ambos.

[7] El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con el punto [5] o [6], en el que el segundo principio activo es un  
 inhibidor del punto de control inmunitario o un inhibidor de PD-1.

[8] El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [5] a [7], en el que el  
 antagonistas de EP4 es al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: ácido 4-[(1S)-1-[[5-  
 55            cloro-2-(3-fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil]amino]etil]benzoico (Compuesto A), ácido 4-((1S)-1-[[5-cloro-2-(4-  
 fluorofenoxi)benzoil]amino]etil]benzoico (Compuesto B), y 3-[2-(4-{2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-  
 il})fenil]etil]-1-[(4-metilbenceno)sulfonil]urea (Compuesto C), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[9] Una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento del cáncer de hígado asociado a NASH  
 que comprende un antagonista de EP4 y un aditivo, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

[10] La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con el punto [9], que comprende además un segundo  
 60            principio activo y/o un anticuerpo antitumoral.

[11] La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con el punto [9] o [10], en el que el antagonistas de EP4  
 es al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: ácido 4-[(1S)-1-[[5-cloro-2-(3-  
 fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil]amino]etil]benzoico (Compuesto A), ácido 4-((1S)-1-[[5-cloro-2-(4-  
 fluorofenoxi)benzoil]amino]etil]benzoico (Compuesto B), y 3-[2-(4-{2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-  
 65            il})fenil]etil]-1-[(4-metilbenceno)sulfonil]urea (Compuesto C),  
 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[12] Un antagonista de EP4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método de tratamiento del cáncer de hígado asociado a NASH en un ser humano o un animal.

[13] El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con el punto [12], en el que el antagonista de EP4 se usa junto con un segundo principio activo, una terapia antitumoral, o ambos.

5 [14] El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con el punto [12] o [13], en el que el antagonistas de EP4 es al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: ácido 4-[(1S)-1-[[5-cloro-2-(3-fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil]amino]etil]benzoico (Compuesto A), ácido 4-((1 S)-1-[[5-cloro-2-(4-fluorofenoxi)benzoil]amino]etil]benzoico (Compuesto B), y 3-[2-(4-{2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il}fenil)etil]-1-(4-metilbenceno)sulfonil]urea (Compuesto C),  
 10 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

**{Efectos ventajosos de la invención}**

15 Por tanto, los compuestos de la invención son útiles para pacientes que necesitan recibir tratamiento por un cáncer de hígado asociado a NASH.

**{Breve descripción de los dibujos}**

20 El Compuesto A antagonista de EP4 inhibe el desarrollo de tumor hepático en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por obesidad (NPL 15: Ohtani et al., Cancer Research, 2014, 74:1885-1889).

Fig. 1

25 La Fig. 1 representa gráficamente una línea temporal de un modelo de ratón desarrollada mediante el tratamiento con 7,12-dimetilbenz(a)antraceno ("DMBA"), y por alimentación con una dieta de alto contenido de grasa (HFD). El Compuesto A se administró a los ratones diariamente desde las 19 semanas de edad hasta las 30 semanas de edad y después se sometieron a eutanasia ("Eut").

Fig. 2

30 La Fig. 2 son fotografías macroscópicas del hígado aislado de los ratones tratados con vehículo (izquierda) y de los ratones tratados con el Compuesto A (derecha). En este modelo de ratón, la expresión de EP4, pero no de otros receptores de PGE2, estuvo significativamente sobrerregulada en tejidos tumorales. Los ratones se trataron con Compuesto A o vehículo (n=5, cada uno) diariamente desde las 19 semanas de edad hasta las 30 semanas de edad. Las flechas indican los carcinomas hepatocelulares (HCC).

Fig. 3

35 La Fig. 3 representa gráficamente el número medio de tumores hepáticos y su distribución del tamaño relativa (clasificados como >6 mm, 2 - 6 mm, ≤ 2 mm). "NS" indica no significativo. El tratamiento con el Compuesto A inhibió significativamente el número de tumores en el hígado, en comparación con los ratones tratados con vehículo. Las colonias tumorales que miden más de 6 mm desaparecieron completamente después de la terapia con Compuesto A.

Fig. 4

40 La Fig. 4 representa gráficamente el promedio de peso corporal del grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con el Compuesto A a la edad de 30 semanas. Los datos se representan como la media ± DE. El tratamiento diario con el Compuesto A no afectó a los pesos corporales de los ratones. Por tanto, el Compuesto A demostró una inhibición significativa del desarrollo del cáncer de hígado sin pérdida de peso en los ratones.

Fig. 5

45 La Fig. 5A representa gráficamente el análisis mediante citometría de flujo de las células inmunitarias entre los ratones tratados con vehículo o los ratones tratados con el Compuesto A. Los porcentajes de MHC CD11c<sup>hi</sup> de clase II (MHC II)<sup>hi</sup> totales, MHC CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>hi</sup> II<sup>hi</sup>, o CD103<sup>+</sup> CD11c<sup>hi</sup> MHC II<sup>hi</sup> se analizaron mediante citometría de flujo. Los datos se representan como la media ± SEM.

50 La Fig. 5B representa gráficos de puntos de la expresión de CD11b y CD103 en los compartimentos celulares de CD11c<sup>hi</sup> MHC clase II<sup>hi</sup> de hígados de ratones tratados con vehículo (izquierda) y ratones tratados con Compuesto A (derecha). Los números de los gráficos indican los porcentajes de células en la clasificación indicada.

55 Las frecuencias de las células dendríticas (DC) CD11c<sup>hi</sup> MHC clase II<sup>hi</sup> y DC CD11b<sup>+</sup> no se modificaron mediante el tratamiento con el Compuesto A. La población de DC CD103<sup>+</sup>, DC esenciales para las respuestas inmunitarias contra el cáncer, aumentaron en el grupo tratado con el Compuesto A.

Fig. 6

60 la Fig. 6A representa gráficamente los porcentajes de CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> analizadas mediante citometría de flujo. Se calculó la relación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> a Treg CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>. Los datos se representan como la media ± SEM. NS = no significativo, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

65 La Fig. 6B representa gráficos de puntos de la expresión de Foxp3 en los compartimentos celulares de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de hígados de ratones tratados con vehículo (izquierda) y ratones tratados con Compuesto A (derecha). Los números de los gráficos indican los porcentajes de células en la clasificación indicada.

La frecuencia de los linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Tregs), pero no de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>, se redujo significativamente mediante el tratamiento con el Compuesto A. Además, la relación entre los linfocitos T CD8<sup>+</sup> T y los Tregs aumentó en los ratones tratados con Compuesto A, aunque la frecuencia de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> no se alteró.

Fig. 7

En la Fig. 7A, los porcentajes de células CD69<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> se analizaron mediante citometría de flujo (\*p <0,05, \*\*p < 0,01).

La Fig. 7B representa gráficamente la expresión de CD69 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> T en hígados de ratones tratados con vehículo (izquierda) y ratones tratados con Compuesto A (derecha). Los números del histograma indican el porcentaje de linfocitos CD69<sup>+</sup>.

El número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresan el marcador de activación CD69 aumentó significativamente en hígados de ratones tratados con Compuesto A. Este resultado indica que el tratamiento con el Compuesto A activa las funciones de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> T en el tejido tumoral. Fig. 8

En la Fig. 8A, los porcentajes de células PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> se analizaron mediante citometría de flujo (\*p <0,05, \*\*p < 0,01).

La Fig. 8B representa gráficamente la expresión de PD-1 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> T en hígados de ratones tratados con vehículo (izquierda) y ratones tratados con Compuesto A (derecha). Los números del histograma indican el porcentaje de linfocitos PD-1<sup>+</sup>.

La administración del Compuesto A redujo significativamente el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresaban la muerte celular programada 1 (PD-1), un receptor inhibitor clave de los linfocitos T en el microambiente tumoral.

#### {Descripción de realizaciones}

Los compuestos de la invención que son útiles para el tratamiento del cáncer de hígado asociado a NASH son:

ácido 4-[(1S)-1-[[5-cloro-2-(3-} piridin-3-il]carbonil]amino]etil]benzoico (Compuesto A),  
 ácido 4-((1S)-1-[[5-cloro-2-(4-fluorofenoxi)benzoil]amino]etil]benzoico (Compuesto B), y  
 3-[2-(4-{2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il})fenil]etil]-1-[(4-metilbenceno)sulfonyl]urea (Compuesto C,

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los compuestos de la invención también incluyen los solvatos, complejos, polimorfos, profármacos, isómeros, y compuestos marcados con isotipos de los mismos.

Los compuestos de la invención se divulgan en el documento WO 2005/021508.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido y base de los mismos. Las sales de adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas. Los ejemplos incluyen las sales de acetato, aspartato, benzoato, besilato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, borato, camsilato, citrato, edisilato, esilato, formiato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hexafluorofosfato, hibenzato, clorhidrato/cloruro, bromhidrato/bromuro, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, malato, maleato, malonato, mesilato, metilsulfato, naftilato, 2-napsilato, nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrogenofosfato/dihidrogenofosfato, sacarato, estearato, succinato, tartrato, tosilato y de trifluoroacetato.

Las sales de base adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas. Los ejemplos incluyen las sales de aluminio, arginina, benzatina, calcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnesio, meglumina, olamina, potasio, sodio, trometamina y cinc.

Para una revisión de las sales adecuadas, véase "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

Una sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos de la invención se puede prepararse fácilmente mezclando soluciones del compuesto de la presente invención y el ácido y la base según sea adecuado. La sal puede precipitar de la solución y recogerse por filtración o puede recuperarse por evaporación del disolvente. El grado de ionización de la sal resultante puede variar entre completamente ionizado a prácticamente no ionizado.

Los compuestos de la invención pueden existir en las formas tanto no solvatadas como no solvatadas. El término "solvato" se usa en el presente documento para describir un complejo molecular que comprende el compuesto de la invención y una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol.

Incluidos en el alcance de la invención se encuentran complejos como los clatratos, complejos de inclusión fármaco-hospedados en los que, a diferencia de los solvatos anteriormente mencionados, el fármaco y el hospedador están

presentes en cantidades estequiométricas o no estequiométricas. Se incluyen también complejos del fármaco que contienen dos o más componentes orgánicos y/o inorgánicos que pueden estar en cantidades estequiométricas o no estequiométricas. Los complejos resultantes pueden estar ionizados, parcialmente ionizados, o no ionizados. Para una revisión de dichos complejos, véase *J. Pharm. Sci.*, 64(8):1269-1288 de Haleblan (Agosto de 1975).

5 A partir de ahora en el presente documento, todas las referencias a los compuestos de la invención incluyen referencias a sus sales, solvatos y complejos y a los solvatos y complejos de sus sales.

10 Los compuestos de la invención incluyen los compuestos de la invención, que se han definido anteriormente en el presente documento, polimorfos, profármacos e isómeros de los mismos (incluidos los isómeros ópticos, geométricos y tautoméricos) como se definen a partir de ahora en el presente documento y compuestos de la invención isotópicamente marcados.

15 Como se ha indicado anteriormente, la invención incluye todos los polimorfos de los compuestos de la invención, tal como se definen en el presente documento.

20 También el alcance de la invención incluye los denominados "profármacos" de los compuestos de la invención. Por consiguiente, algunos derivados del compuesto de la invención que pueden tener poca o ninguna actividad farmacológica por sí mismos pueden, cuando se administran a o se aplican sobre el cuerpo, convertirse en los compuestos que tienen la fórmula de uno cualquiera de los compuestos de la invención que tengan la actividad deseada, por ejemplo, mediante escisión hidrolítica. Dichos derivados se denominan como "profármacos". Se puede encontrar más información sobre el uso de profármacos en 'Prodrugs as Novel Delivery Systems', Vol. 14, ACS Symposium Series (T. Higuchi y W. Stella) y 'Bioreversible Carriers in Drug Design', Pergamon Press, 1987 (ed. E. B. Roche, American Pharmaceutical Association).

25 Los profármacos de acuerdo con la presente invención se pueden producir, por ejemplo, sustituyendo las funcionalidades adecuadas presentes en los compuestos de la invención por algunos restos conocidos de los expertos en la materia como "prorrestos" tal como se describe, por ejemplo, en "Design of Prodrugs" de H Bundgaard (Elsevier, 1985).

30 Algunos ejemplos de profármacos de acuerdo con la presente invención incluyen:

- (i) donde el compuesto de la invención contiene una funcionalidad de ácido carboxílico (-COOH), y éster del mismo, por ejemplo, sustitución del átomo de hidrógeno con alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);
- 35 (ii) donde el compuesto de la invención contiene una funcionalidad alcohol (-OH), un éter del mismo, por ejemplo, sustitución del átomo de hidrógeno con alcanoiloximetilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); y
- (iii) donde el compuesto de la invención contiene una funcionalidad de amina primaria o secundaria (-NH<sub>2</sub> o -NHR donde R no es H), una amida del mismo, por ejemplo, sustitución de uno o ambos átomos de hidrógeno por alcanoil (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>).

40 Ejemplos adicionales de grupos sustituyentes diferentes a los ejemplos anteriores son conocidos por los expertos en la materia y se pueden encontrar en las referencias anteriormente mencionadas, aunque no de forma limitativa a los mismos.

45 Por último, los compuestos de la invención pueden actuar también ellos mismos como profármacos de otros compuestos de la invención.

50 Los compuestos de la invención que contienen uno o más átomos de carbono asimétricos pueden existir como dos o más estereoisómeros. Cuando un compuesto de la invención contiene n grupo alqueno o alquenoileno, son posibles isómeros geométricos (o Z/E). Cuando el compuesto contiene, por ejemplo, un grupo ceto u oxima o un resto aromático, puede aparecer isomería tautomérica ("tautomería"). Por lo tanto, un único compuesto puede mostrar más de un tipo de isomería.

55 Se incluyen dentro del ámbito de la invención todos los estereoisómeros, isómeros geométricos, y formas tautoméricas de los compuestos de la invención, incluidos compuestos que presentan más de dos tipos de isomerismo igual, y mezclas de uno o más de los mismos. También están incluidas las sales de adición de ácido o base en las que el contraión es ópticamente activo, por ejemplo, D-lactato o L-lisina, o racémico, por ejemplo, DL-tartrato o DL-arginina.

60 Los isómeros cis/trans se pueden separar mediante técnicas convencionales bien conocidas de los expertos en la materia, por ejemplo, cromatografía y cristalización fraccionada.

Las técnicas convencionales para la preparación/aislamiento de enantiómeros individuales incluyen síntesis quiral a partir de un precursor ópticamente puro adecuado o resolución del racemato (o el racemato de una sal o derivado) usando, por ejemplo, cromatografía líquida quiral a alta presión (HPLC).

65 Como alternativa, el racemato (o un precursor racémico) se puede hacer reaccionar con un compuesto adecuado

ópticamente activo, por ejemplo, un alcohol, o, en el caso en que el compuesto de la invención contiene un resto ácido o básico, un ácido o base tal como ácido tartárico o 1-feniletilamina. La mezcla diastereomérica resultante se puede separar mediante cromatografía y/o cristalización fraccionada, y uno o ambos de los diastereoisómeros convertirse en el(los) correspondiente(s) enantiómero(s) puro(s) por medios bien conocidos por el experto en la técnica.

5 Los compuestos quirales de la invención (y sus precursores quirales) se pueden obtener de forma enantioméricamente enriquecida mediante el uso de cromatografía, habitualmente HPLC, en una resina asimétrica con una fase móvil compuesta de un hidrocarburo, habitualmente heptano o hexano, que contiene de 0 a 50 % (p/p) de isopropanol, de forma típica de 2 al 20 % (p/p), y de 0 al 5 % (p/p) de una alquilamina, de forma típica un 0,1 % (p/p) de dietilamina. La concentración del eluato da como resultado la mezcla enriquecida.

10 Los conglomerados estereoisoméricos se pueden separar mediante técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Stereochemistry of Organic Compounds de E L Eliel (Wiley, Nueva York, 1994)).

15 La invención incluye todos los compuestos isotópicamente marcados farmacéuticamente aceptables de la invención en la que uno o más átomos se han sustituido por átomos que tienen el mismo número atómico, pero una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra habitualmente en la naturaleza.

20 Los ejemplos de isótopos adecuados para su inclusión en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, tales como  $^2\text{H}$  y  $^3\text{H}$ , carbono, tales como  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{14}\text{C}$ , cloro, tal como  $^{36}\text{Cl}$ , flúor, tal como  $^{18}\text{F}$ , yodo, tal como  $^{123}\text{I}$  y  $^{125}\text{I}$ , nitrógeno, tales como  $^{13}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ , oxígeno, tales como  $^{15}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$  y  $^{18}\text{O}$ , fósforo, tal como  $^{32}\text{P}$ , y azufre, tal como  $^{35}\text{S}$ .

25 Algunos compuestos de la presente invención marcados isotópicamente, por ejemplo, los que incorporan un isótopo radiactivo, son útiles en los estudios de distribución de fármacos y/o tejidos sustrato asociados con el tratamiento canceroso que incluyen el diagnóstico, alivio de los síntomas, mejora de calidad de vida, y profilaxia. Los isótopos radiactivos tritio, es decir  $^3\text{H}$ , y carbono-14, es decir  $^{14}\text{C}$ , son particularmente útiles para este propósito a la vista de su facilidad de incorporación y medios de detección disponibles.

30 La sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio, es decir,  $^2\text{H}$ , puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas que dan como resultado mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, mayor semivida in vivo o menores requisitos de dosificación y, por lo tanto, pueden preferirse en algunas circunstancias.

35 La sustitución con isótopos que emiten positrones, tales como  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{15}\text{O}$  y  $^{13}\text{N}$ , puede ser útil en estudios de tomografía por emisión de positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor en el sustrato.

40 Los compuestos isotópicamente marcados de la invención pueden generalmente prepararse mediante técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia o por procesos análogos a los descritos en los Ejemplos y Preparaciones adjuntos usando un reactivo marcado isotópicamente adecuado en lugar del reactivo no marcado empleado anteriormente.

45 Los solvatos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la invención incluyen aquellos en los que el disolvente de cristalización puede estar sustituido isotópicamente, por ejemplo  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{d}_6$ -acetona,  $\text{d}_6$ -DMSO.

50 Los compuestos de la invención previstos para uso farmacéutico pueden administrarse como producto cristalino o amorfo. Se pueden obtener, por ejemplo, como tapones sólidos, polvos, o películas mediante procedimientos tales como precipitación, cristalización, criodesecación, o secado por pulverización, o secado evaporativo. El secado mediante microondas o radiofrecuencias se puede utilizar con este fin.

55 Cada uno de los compuestos de la invención (es decir, el compuesto A, B o C) se puede administrar en solitario o combinados o junto con uno o más fármacos adicionales (o como cualquier combinación de los mismos). En general, se administrarán como una formulación en asociación con uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables. El término "aditivo" se usa en el presente documento para describir cualquier ingrediente distinto a los compuestos de la invención. La selección de aditivo en gran medida dependerá de varios factores, tales como, del modo de administración particular, el efecto del aditivo sobre la solubilidad y la estabilidad y la naturaleza de la forma farmacéutica. Los compuestos de la invención se pueden administrar solos o junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable a través de cualquiera de las rutas anteriores indicadas anteriormente y dicha administración puede llevarse a cabo en una sola o en múltiples dosis. Más particularmente, los compuestos de la invención se pueden administrar a una amplia variedad de diferentes formas farmacéuticas, es decir, se pueden combinar con diversos vehículos inertes farmacéuticamente aceptables en forma de comprimidos, cápsulas, pastillas, trociscos, caramelos duros, polvos, pulverizaciones, cremas, bálsamos, supositorios, gelatinas, geles, pastas, lociones, pomadas, suspensiones acuosas, soluciones inyectables, elixires, jarabes y similares. Dichos vehículos incluyen diluyentes sólidos o cargados, medios acuosos estériles y diversos disolventes orgánicos no tóxicos, etc. Además, las composiciones farmacéuticas orales pueden endulzarse y/o aromatizarse de manera adecuada. En

general, los compuestos de la invención están presentes en dichas formas de dosificación a niveles de concentración en el intervalo de 5 % al 95 % en peso. Para administración oral, los comprimidos contienen varios excipientes tales como celulosa microcristalina, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dipotásico y glicina se pueden emplear junto con varios disgregantes tales como almidón y preferentemente maíz, almidón de patata o tapioca, ácido algínico y determinados silicatos complejos, junto con aglutinantes para granulación, tales como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y goma arábiga. Además, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco frecuentemente son muy útiles con fines de formación de comprimidos. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas para cápsulas de gelatina; los materiales preferidos a este respecto también incluyen lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de elevado peso molecular. Cuando se desean suspensiones y/o elixires acuosos para administración oral, el principio activo puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materiales colorantes o tintes y, si así se desea, también agentes emulsionantes y/o de suspensión, junto con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y diversas combinaciones similares de los mismos.

Por consiguiente, la invención proporciona también los compuestos de la invención, un solvato de los mismos, un profármaco del mismo, una combinación de los mismos, y una combinación con uno o más principios activos farmacológicamente activos. Además, la invención proporciona una composición farmacéutica para uso en un método de tratamiento del cáncer de hígado asociado a NASH que comprende los compuestos de la invención y un aditivo, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, especialmente para su uso en el tratamiento de cáncer de hígado asociado a NASH. Asimismo, se describe en el presente documento un kit que comprende: una primera composición farmacéutica que comprende los compuestos de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable; una segunda composición farmacéutica; y un envase. Además, la segunda composición farmacéutica puede comprender el compuesto de la invención.

Un kit para su uso en el tratamiento de cáncer de hígado asociado a NASH, que incluye los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, también se describe en el presente documento. Un paquete comercial que comprende la composición farmacéutica que comprende los compuestos de la invención, o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y una nota escrita asociada a las mismas, en el que la nota escrita establece que los compuestos se pueden usar o se deben usar para tratar el cáncer de hígado asociado a NASH es también un aspecto adicional.

Los compuestos de la invención se administran en una cantidad eficaz para hacer retroceder el cáncer, reducir el tamaño del tumor del cáncer, reducir la metástasis cancerosa, regular las funciones inmunitarias, y/o potenciar la eficacia del tratamiento contra el cáncer. Dicha cantidad terapéutica eficaz varía de acuerdo con el compuesto específico de la invención, la dolencia específica a tratar, la dolencia del paciente, la vía de administración, la formulación, el campo de decisión, y otros factores. A la luz de la divulgación, dependiendo de las cosas conocidas por los expertos en la materia, se decide mediante técnicas de optimización rutinarias. Los compuestos de la invención se pueden administrar por cualquiera de las vías oral, parenteral o tópica a los mamíferos. En general, estos compuestos son los que se administran de forma más deseable a los seres humanos a dosificaciones comprendidas de 1 mg a 1000 mg, preferentemente de 10 mg a 600 mg, que se pueden administrar en una sola dosis o en dosis divididas a lo largo del día, aunque necesariamente se producirán variaciones dependiendo del peso y estado de salud del sujeto que se está tratando, la patología que se está tratando, y de la vía de administración concreta escogida.

Una composición farmacéutica puede incluir los compuestos de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un medio de transporte o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "medio de transporte farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medio de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El medio anterior puede incluir también otros principios activos o inactivos y se dirige a tejidos cancerosos basados en la composición.

Se puede determinar la eficacia terapéutica de los compuestos de la invención a la luz de esta divulgación mediante procedimientos terapéuticos normalizados en cultivos animales o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DE50 (la dosis terapéutica eficaz en el 50 % de la población).

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y de estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosis puede variar dependiendo de la formulación y la ruta de administración. Para cualquier antagonista del receptor EP4 utilizado en el método de la invención (es decir, el compuesto A, B o C), se puede estimar la dosis terapéuticamente eficaz inicialmente a partir de los ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración circulante que incluya la  $CI_{50}$  determinada en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos o animales. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Los expertos en la materia saben bien que determinados factores tienen influencia sobre la dosificación y temporalización requerida para tratar eficazmente a un mamífero, entre lo que se incluyen, aunque no de forma

limitativa, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos anteriores, el estado de salud general y/o la edad del mamífero, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento del mamífero con una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la invención puede incluir, aunque no de forma limitativa, un único tratamiento, tratamiento de días alternos, o una serie de tratamientos. Los compuestos de la invención se pueden administrar por cualquiera de las vías oral, parenteral o tópica a los mamíferos. En general, estos compuestos se administran de la forma más deseable a seres humanos, por ejemplo, una vez al día, o en de dos a cuatro porciones divididas al día.

La cantidad precisa de los compuestos administrados a un paciente humano será particularmente responsabilidad del médico a cargo del tratamiento. Sin embargo, la dosis utilizada puede depender de numerosos factores entre las que se incluyen las necesidades del paciente, la dolencia precisa que se está tratando y su gravedad, y la vía de administración. En el caso de administración oral, por ejemplo, una dosificación diaria en términos de los compuestos de la invención está habitualmente en la magnitud de aproximadamente 0,02 a 200 mg, y preferentemente de aproximadamente 0,1 a 100 mg, por 1 kg de peso corporal o un mamífero (incluido un ser humano), que se puede administrar una vez al día o de dos a cuatro porciones al día. Más particularmente, por ejemplo, administración a seres humanos, es aproximadamente de 0,02 a 20 mg, por kg de peso corporal, al día, más particularmente, de aproximadamente 0,2 a 12 mg, por kg de peso corporal, al día. La administración a perros, por ejemplo, es de aproximadamente 0,5 a 25 mg, por kg de peso corporal, al día, más particularmente, preferentemente de 1 a 10 mg, por kg de peso corporal, al día. La administración a ratones, por ejemplo, es de aproximadamente 1 a 100 mg, por kg de peso corporal, al día, más particularmente, aproximadamente de 3 a 30 mg, por kg de peso corporal, al día.

Los compuestos de la invención se administran convenientemente en forma de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer de hígado asociado a NASH. Dicha composición se puede presentar convenientemente para su uso de manera convencional en premezcla con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Aunque es posible que los compuestos de la invención se administren como el producto químico impuro, es preferible presentarlo como una composición farmacéutica en la forma de una composición farmacéutica. Las formulaciones comprenden por tanto los compuestos junto con uno o más vehículos o diluyentes aceptables y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El vehículo o vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatible con los ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el receptor de los mismos.

Una formulación farmacéutica se formula para que sea adecuada a la ruta de administración deseable. La vía de administración es, por ejemplo, administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, en la piel, subcutánea), oral (por ejemplo, ingestión o inhalación), percutánea (local), mucosal, y rectal, y local (incluida la percutánea, oral, y sublingual). Una composición farmacéutica formulada como una solución o suspensión se puede preparar por el método descrito en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990).

La vía de administración más adecuada puede ser diferente dependiendo, por ejemplo, de la dolencia y el trastorno del paciente que recibe el tratamiento. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el compuesto (es decir, el "principio activo") con el vehículo que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme y estrecha el principio activo con un vehículo líquido o un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto en la formulación deseada.

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas, tales como cápsulas, sellos o comprimidos (por ejemplo, comprimidos masticables para administración pediátrica) conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; como polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también se puede presentar como un bolo, electuario o pasta.

Un comprimido se puede preparar por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Se pueden preparar comprimidos preparados mediante compresión del principio activo en una máquina adecuada en forma de flujo libre, tal como polvos o gránulos, mezclado de forma opcional con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, lubricante, tensioactivo o dispersante. Se pueden preparar comprimidos moldeados moldeando en una máquina adecuada una mezcla del principio activo en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos opcionalmente pueden recubrirse o ranurarse y pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo de los mismos.

Las formulaciones para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hagan que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en contenedores monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado criodesecado (liofilizado) que solo

requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente.

- 5 Las formulaciones para administración rectal pueden presentarse como un supositorio con los vehículos normales tales como manteca de cacao, grasa dura o polietilenglicol.

Las formulaciones para la administración tópica en la boca, por ejemplo, por vía bucal o sublingual, incluidas pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada tal como sacarosa y goma arábiga o tragacanto, y pastillas que comprenden el principio activo en una base tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga.

15 Los compuestos de la presente invención también se pueden formular como preparaciones de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante un implante (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por consiguiente, por ejemplo, los compuestos de la invención pueden formularse con materiales poliméricos adecuados o hidrófobos (por ejemplo en forma de una emulsión en aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles, por ejemplo, una sal muy poco soluble.

20 Además de los ingredientes concretos anteriormente mencionados, las formulaciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, los adecuados para la administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

25 Los principios activos secundarios, que son moléculas pequeñas, se pueden usar también para aliviar los efectos adversos asociados con la administración de los compuestos de la presente invención. Sin embargo, al igual que algunas moléculas grandes, se cree que muchas de ellas pueden proporcionar un efecto sinérgico cuando se administran con (por ejemplo, antes, después o simultáneamente) los compuestos de la presente invención. Los ejemplos de principios activos secundarios de molécula pequeña incluyen, aunque no de forma limitativa, agentes anticancerosos, antibióticos, agentes inmunosupresores, y esteroides.

30 También se describen en el presente documento combinaciones de compuestos farmacéuticos independientes en forma de kit. El kit comprende dos composiciones farmacéuticas independientes; un compuesto de la invención; y un principio activo secundario como se describe en el presente documento. El kit comprende un recipiente para contener las composiciones separadas, tales como, un frasco dividido, o un envase en lámina de aluminio dividida, sin embargo, las composiciones separadas pueden estar contenidas en un único recipiente sin dividir. Normalmente, el kit comprende instrucciones para administrar los componentes separados. La forma del kit es particularmente ventajosa cuando se administran preferentemente los componentes separados en formas farmacéuticas diferentes (por ejemplo, oral y parenteral), administrados en diferentes intervalos de dosificación, o cuando se desea la valoración de los componentes individuales de la combinación por el médico a cargo del tratamiento.

40 Un ejemplo de dicho kit es el denominado envase de tipo blíster. Los envases de tipo blíster son bien conocidos en la industria del envasado y se usan ampliamente para el envasado de formas farmacéuticas unitarias (comprimidos, cápsulas y similares). Los envases de tipo blíster contienen una lámina de material relativamente rígido cubierta con una hoja de un material plástico preferentemente transparente. Durante el proceso de envasado, se forman rebajes en la hoja de plástico. Los rebajes tienen el tamaño y la forma de los comprimidos o cápsulas que se van a envasar. A continuación, los comprimidos o cápsulas se colocan en los rebajes y la lámina de material relativamente rígido se precinta contra la hoja de plástico en la cara de la hoja que es opuesta a la dirección en la que se formaron los rebajes. Como resultado, los comprimidos o las cápsulas se precintan en los rebajes entre la hoja de plástico y la lámina. Preferentemente, la resistencia de la lámina es tal que los comprimidos o las cápsulas se pueden extraer del envase blíster aplicando manualmente presión sobre los rebajes, mediante la cual se forma una abertura en la lámina en el lugar de los rebajes. El comprimido o la cápsula se puede entonces extraer a través de dicha abertura.

55 En determinadas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento comprenden administrar los compuestos de la invención con uno o más principios activos secundarios, y/o junto con radioterapia y/o cirugía. Los ejemplos del principio activo secundario incluyen, por ejemplo, antagonistas de EP4 adicionales, inhibidores del punto de control inmunitario, inhibidores de PD-1, inhibidores de PD-L1, inhibidores de CTLA4, terapias con células inmunitarias adoptivas, vacunas contra el cáncer, y otros fármacos inmunooncológicos dirigidos, por ejemplo, el receptor del factor estimulantes de colonias 1 (CSF1 R), indolamina 2,3-dioxitena (IDO), o antígeno carcinoembrionario (CEA). Además, fármacos contra el cáncer dirigidos molecularmente, y compuestos quimioterapéuticos del cáncer también como principio activo secundario. Más particularmente, los principios activos secundarios incluyen, por ejemplo, anticuerpos del PD-1 tales como nivolumab, lambrolizumab/pembrolizumab, REGE2810, anticuerpos del PD-L1 tales como elumab, atezolizumab, durvalumab, pembrolizumab, anticuerpos de CTLA-4 tales como ipilimumab y tremelimumab, fármacos dirigidos molecularmente tales como un anticuerpo dirigido contra HER2, anticuerpo dirigido contra VEGF, anticuerpo dirigido contra EGFR, inhibidores de la tirosina quinasa contra el receptor de EGFR, receptor de PDGFR, quinasas del receptor del VEGF, c-kit, y Bcr-Abl, y compuestos quimioterapéuticos antitumorales tales como agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, fármacos

antiinfectivos, inhibidores de los microtúbulos, compuestos terapéuticos hormonales, fármacos de platino, inhibidores de topoisomerasa, compuestos terapéuticos del humor como inhibidores de la aromatasas, fármacos antiestrogénicos, fármacos antiandrógenos, progesterona, estradiol, agonistas de LHRH, e inmunoterapias tales como terapia adoptiva de linfocitos T, terapia adoptivas con células inmunitarias, terapia adoptivas con linfocitos NK y  
 5 terapia de vacunas contra el cáncer. La administración de los compuestos de la invención y los principios activos secundarios a un paciente puede producirse simultánea o secuencialmente mediante la misma o diferentes rutas de administración. La idoneidad de una vía de administración concreta empleada por un principio activo concreto dependerá del propio principio activo (por ejemplo, si se puede administrar por vía oral sin descomponerse antes de penetrar en el torrente sanguíneo) y de la enfermedad que se está tratando. Las rutas de administración recomendadas  
 10 para los principios activos secundarios son conocidas por las personas normalmente expertas en la materia. La radioterapia incluye todas las terapias indicadas para el cáncer de hígado, por ejemplo, terapia de haces de protones. La cirugía incluye todas las terapias indicadas para la terapia del cáncer de hígado.

#### Definición de términos

"Antagonista de EP4" se refiere a un compuesto que inhibe o bloquea la señalización celular desencadenada por la interacción de la PGE2 con el receptor de EP4. Los ejemplos de antagonistas de EP4 incluyen, aunque no de forma limitativa, ER-819762, MK-2894, MF 498, ONO-AE3-208, evatanepag, ONO-AE2-227, BGC201531, ONO-AE3-240, GW 627368 y AH23848, que se relacionan en la base de datos IUPHAR como antagonistas del receptor de EP4. Los  
 20 Compuestos A, B y C, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos (los compuestos de la invención), son también ejemplos de antagonistas de EP4.

Un "inhibidor del punto de control inmunitario" se refiere a un tipo de fármaco que bloquea algunas proteínas fabricadas por algunos tipos de células inmunitarias, tales como los linfocitos T, y algunos tipos de células cancerosas. Estas proteínas ayudan a mantener las respuestas inmunitarias durante el control y pueden hacer que los linfocitos T sigan destruyendo células cancerosas. Cuando se bloquean estas proteínas, se liberan los frenos del sistema inmunitario y los linfocitos T pueden destruir mejor las células cancerosas. Los ejemplos de inhibidores del punto de control  
 25 inmunitarios incluyen, aunque no de forma limitativa, inhibidores de PD-1, inhibidores de CTLA-4, inhibidores de LAG-3, inhibidores de TIM-3, inhibidores de BTLA, inhibidores de PD-L1, inhibidores de PD-L2, inhibidores de B7-1, inhibidores de B7-2, inhibidores de galectina-9 e inhibidores de la HVEM. Los inhibidores del punto de control inmunitario pueden ser moléculas pequeñas, péptidos, proteínas tales como un anticuerpo, ácidos nucleicos o similares.

"Inhibidor de PD-1" se refiere a un anticuerpo u otra molécula que inhiba la función de la proteína de muerte programada 1 (PD1). Los inhibidores/anticuerpos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, los anticuerpos definidos en las patentes de Estados Unidos números 7.029.674, 7.488.802, 7.521.051, 8.008.449, 8.354.509, 8.617.546 y 8.709.417. Las realizaciones particulares del anticuerpo incluyen MDX-1106/nivolumab, BMS-936558, (Bristol-Myers Squibb), lambrolizumab (Merck), MK-3475/pembrolizumab (marca comercial registrada KEYTRUDA, Merck), AMP-224 (GSK), y CT-011 (Cure Tech).

"Inhibidor de PD-L1" se refiere a un anticuerpo u otra molécula que inhiba la función del ligando de muerte programada 1 (PDL1). Los anticuerpos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, los anticuerpos definidos en las patentes de Estados Unidos números 8.217.149, 8.383.796, 8.552.154 y 8.617.546. En una realización particular, el anticuerpo es MPDL3280A/RG7446 (Roche), BMS-936559 (BMS), MEDI4736 (AstraZeneca), o MSB0010718C (MerckSerono).

"Inhibidor de CTLA4" se refiere a un anticuerpo u otra molécula que inhiba la función del antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA4). Los inhibidores/anticuerpos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos que son antagonistas de CTLA4 o los anticuerpos de CTLA4 definidos en las patentes de Estados Unidos números 8.685.394 y 8.709.417. Algunas realizaciones del anticuerpo incluyen MDX-010 (ipilimumab, Bristol-Myers Squibb) y CP-675.206 (tremelimumab, AstraZeneca). En una realización particular, el anticuerpo es ipilimumab o tremelimumab.

"Tratamiento", "tratar", y "que trata" se refieren a aliviar, inhibir y/o revertir el progreso de un cáncer en un sujeto que lo necesita. El término "que trata" es inclusivo de cualquier indicio de éxito en el tratamiento o la mejoría del cáncer, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como moderación; remisión; disminución de los síntomas o de la creación de la lesión, patología o dolencia más tolerables por el sujeto; retraso o ralentización en la velocidad de progresión, etc. La medición del tratamiento o mejora se puede basar en, por ejemplo, el resultado de una exploración física, una prueba patológica y/o un ensayo diagnóstico como es conocido en la técnica. El tratamiento también puede referirse a reducir la incidencia o el inicio de un cáncer, o una recurrencia del mismo (tal como una prolongación de la duración de la remisión), en comparación con la que se produciría en ausencia de la medida tomada. El término "tratamiento", tal como se usa en el presente documento, incluye no solo la reducción del tejido tumoral sino también el alivio de los síntomas, mejora de la calidad de vida (QOL), y profilaxia (radioterapia, prevención postoperatoria de la recurrencia, quimioterapia auxiliar y similares).

Una "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz para tratar un cáncer como se ha indicado mediante el ensayo y la evaluación clínica, observación de los pacientes, y/o similares. Una "cantidad eficaz" puede además designar una cantidad que produce un cambio detectable en la actividad biológica o química. El experto

en la técnica puede detectar y/o cuantificar adicionalmente los cambios detectables del mecanismo o proceso relevante. Además, una "cantidad eficaz" puede designar una cantidad que mantiene un estado fisiológico deseado, es decir, reduce o evita un deterioro significativo y/o fomenta la mejora de la dolencia. Una "cantidad eficaz" puede referirse además a una cantidad terapéuticamente eficaz.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "una sal farmacéuticamente aceptable" es consistente con los ejemplos anteriormente proporcionados y se refiere a una sal de un ácido orgánico o inorgánico relativamente no tóxica de un compuesto de la invención. Estas sales se pueden preparar in situ, durante el aislamiento y purificación  
10 orgánicas o inorgánicas adecuadas y aislar las sales formadas de esta manera. Las sales de ácido representativas incluyen, aunque no de forma limitativa, sales de acetato, adipato, aspartato, benzoato, besilato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, borato, camsilato, citrato, ciclamato, edisilato, esilato, formiato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hexafluorofosfato, hibenato, clorhidrato/cloruro, bromhidrato/bromuro, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, malato, maleato, malonato, mesilato, metilsulfato, naftilato, 2-napsilato,  
15 nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrogenofosfato/dihidrogenofosfato, piroglutamato, sacarato, estearato, succinato, tanato, tartrato, tosilato, trifluoroacetato y xinafoato. En una realización, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de clorhidrato/cloruro.

"Segundo principio activo" es un fármaco o compuesto biológico de bajo peso molecular que tiene una actividad farmacológicamente eficaz, e incluye, aunque no de forma limitativa, inhibidores de la señalización de PGE2 tales como antagonistas de EP4 adicionales, inhibidor de la prostaglandina E sintasa microsomial (mPGES)-1, inhibidores de COX-2, AINE, e inhibidores del punto de control inmunitario, fármacos inmunitarios dirigidos a células, fármacos contra el cáncer dirigidos molecularmente, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, fármacos antiinfectivos, inhibidores de los microtúbulos, compuestos terapéuticos hormonales, fármacos de platino, inhibidores de topoisomerasa, fármacos dirigidos molecularmente, compuestos terapéuticos contra el cáncer dirigidos molecularmente, compuestos terapéuticos inmunitarios, y así sucesivamente.

"Terapia antitumoral" incluye, aunque no de forma limitativa, terapias con terapia de vacunas antitumorales, y terapia adoptiva de células inmunitarias tales como terapia adoptiva de linfocitos T, terapia adoptiva de células dendríticas o terapia adoptiva de linfocitos NK, y también incluye, aunque no de forma limitativa, radioterapia del cáncer, y terapia con intervención quirúrgica.

"Compuesto biológico incluye", aunque no de forma limitativa, una proteína farmacológicamente activa, tal como interferón gamma, e interleuquina 2, y un péptido, ácido nucleico, y polisacárido farmacológicamente activo.

35 Los "fármacos dirigidos molecularmente" incluyen, aunque no de forma limitativa, un anticuerpo dirigido contra HER2, un anticuerpo dirigido contra VEGF, un anticuerpo dirigido contra EGFR, un inhibidor de la tirosina quinasa contra un receptor de EGFR, receptor de PDGFR, quinasa del receptor de VEGF, c-kit, y Bcr-Abl.

40 "Los "compuestos terapéuticos inmunitarios" incluyen, aunque no de forma limitativa, fármacos inmunorreguladores, terapias con células inmunitarias adoptivas, terapias con vacunas antitumorales, y así sucesivamente.

45 "NASH" se refiere a una esteatohepatitis no alcohólica, un síndrome que se desarrolla en pacientes que no son alcohólicos; produce daños hepáticos que histológicamente no se pueden distinguir de la hepatitis alcohólica. Se desarrolla con mucha frecuencia en pacientes con al menos uno de los siguientes factores de riesgo: obesidad, dislipidemia, e intolerancia a la glucosa. La patogénesis se entiende mal, pero parece estar vinculada a la resistencia a la insulina (por ejemplo, como en la obesidad o síndrome metabólico).

50 "Cáncer de hígado asociado a NASH" se refiere a un cáncer, incluido carcinoma hepatocelular (HCC), y otros cánceres que se producen en órganos relacionados con el hígado, tales como, vasos sanguíneos hepáticos o conductos biliares, que están inducidos y/o asociados con NASH. El cáncer de hígado asociado a NASH es diferente del carcinoma hepatocelular en que está inducido mediante los virus de la hepatitis B o C en lo que respecta a la patogénesis de la enfermedad.

55 "Cáncer metastásico" se refiere a un cáncer en el que las células cancerosas de un órgano o parte del cuerpo se han diseminado (por "metástasis") a otro órgano o parte del cuerpo no adyacente. El cáncer en el órgano o parte del cuerpo no adyacente ("tumor secundario" o "tumor metastásico") incluye células cancerosas que se originan del órgano o parte del cuerpo a parte del cual se han diseminado el cáncer o las células cancerosas. Los sitios en donde se puede producir el tumor incluyen, aunque no de forma limitativa, los ganglios linfáticos, los pulmones, cerebro y/o huesos.

60 La expresión "señal de EP4" o "señalización de EP4", tal como se usa en el presente documento, significa elevación de AMPc y después de las transducciones de la señal en asociación con la estimulación agonista del receptor de EP4.

**Ejemplos****Ejemplo 1:**

- 5 El Compuesto A inhibió el crecimiento del cáncer hepático en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por una dieta con alto contenido de grasa.

## Experimentos animales

- 10 Los ratones C57/BL6 se adquirieron de CLEA Japan Inc. Los ratones Tlr2<sup>-/-</sup> (C57/BL6) se adquirieron de Oriental Yeast Co. Ltd.

## Análisis histológico y de inmunofluorescencia

- 15 Los análisis de tinción con hematoxilina y eosina y de inmunofluorescencia se realizaron como se ha descrito anteriormente (Yoshimoto et al., Nature, 2013, 499:97-101).

## Aislamiento de células inmunitarias

- 20 Las células inmunitarias se obtuvieron de hígados de ratón y se sometieron a la medición de la producción de citoquinas y análisis por citometría de flujo.

## Análisis estadístico

- 25 Los datos se analizaron mediante una prueba de la t no emparejada con corrección de Welch (bilateral) o la prueba de Man-Whitney (bilateral). Los valores de P menores de 0,05 se consideraron significativos. "NS" indica no significativo.

## Resultados del estudio

- 30 Este modelo en ratón se desarrolló por tratamiento con DMBA, 7,12-dimetilbenz(a)antraceno, y por alimentación con una dieta de alto contenido de grasa (HFD) (NPL 15). En este modelo de ratón, la expresión de EP4, pero no de otros receptores de PGE2, quedó significativamente sobrerregulada en tejidos tumorales, lo que sugiere que EP4 podría mediar predominantemente la señalización de PGE2 en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por obesidad. En este experimento, el Compuesto A 30 mg/kg QD se administró diariamente a los ratones desde las 19 semanas de edad hasta las 30 semanas de edad (Figura 1). Como control, un grupo diferente de ratones se trataron solamente con vehículo y sin principio activo. El desarrollo del carcinoma hepatocelular (HCC) en los ratones tratados con Compuesto A se redujo de forma importante en comparación con los ratones tratados con vehículo (Figura 2 y Figura 3). De forma destacable, sin embargo, el tratamiento con el Compuesto A no alteró el peso corporal (Figura 4).

- 45 Se evaluó el impacto del bloqueo de EP4 sobre la prevalencia y estado de activación de las células inmunitarias. Aunque las frecuencias de las células dendríticas CD11c<sup>+</sup> MHC clase II<sup>+</sup> (DC) y DC CD11b<sup>+</sup> no se alteraron, la población de DC CD103<sup>+</sup>, que son esenciales para las respuestas inmunitarias contra el cáncer (NPL 16: Fuertes et al., J. Exp. Med., 2011, 208:2005-2016; NPL 17: Salmon et al., Immunity, 2016, 44:924-938; y NPL 18: Zelenay et al., Cell, 2015, 162:1257-1270), aumentó en el grupo tratado con Compuesto A (Figura 5). La frecuencia de los linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Tregs), pero no de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>, se redujo significativamente mediante el tratamiento con el Compuesto A (Figura 6). Además, la relación entre los linfocitos T CD8<sup>+</sup> T y los Tregs aumentó en los ratones tratados con Compuesto A, aunque la frecuencia de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> no se alteró (Figura 6). Además, el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresan el marcador de activación CD69 aumentó significativamente en hígados de ratones tratados con Compuesto A (Figura 7). Por el contrario, la administración del Compuesto A redujo significativamente el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresaban la muerte celular programada 1 (PD-1), un receptor inhibitorio clave de los linfocitos T en el microambiente tumoral (Figura 8). Estos resultados sugieren que el bloqueo de la ruta de EP4 podría reactivar la inmunidad antitumoral en el microentorno tumoral hepático asociado a NASH.

- 55 Conclusión

- 60 El Compuesto A antagonista de EP4 inhibió significativamente el crecimiento y desarrollo en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por obesidad. El tratamiento con Compuesto A del modelo en ratón aumentó las frecuencias del subtipo de DC que es esencial para la respuesta inmunitaria contra el cáncer (CD103<sup>+</sup>) y disminuyó la expresión de PD-1 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos en el tejido tumoral. El tratamiento con Compuesto A también disminuyó la población de linfocitos Treg inmunosupresores (Foxp3<sup>+</sup>) en tejidos tumorales.

**Ejemplo 2:**

- 65 Se espera que el Compuesto A junto con un anticuerpo de PD-1 muestre una eficacia antitumoral superior a la del

Compuesto A en solitario en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por HFD.

Métodos de estudio

5 Se usaría el mismo modelo en ratón que en el Ejemplo 1 para someter a ensayo la eficacia del Compuesto A junto con un anticuerpo de PD-1 en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por HFD. En consecuencia, Se repitió el Ejemplo 1, salvo que también se administró un anticuerpo de PD-1 con el Compuesto A en el grupo tratado con Compuesto A.

10 Resultados

Se espera que la terapia con el Compuesto A junto con el anticuerpo de PD-1 muestra eficacia antitumoral superior a los ratones tratados con el Compuesto A del Ejemplo 1 en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por HFD.

15 **Ejemplo 3:**

Se espera que el tratamiento con el Compuesto B inhiba el crecimiento del cáncer hepático en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por HFD.

20 Métodos de estudio

Se usaría el mismo modelo en ratón que en el Ejemplo 1 para someter a ensayo la eficacia del Compuesto B. De esta forma, se repitió el Ejemplo 1, salvo que se usó el Compuesto B en lugar del Compuesto A.

25 Resultados del estudio

Se espera que la terapia con el Compuesto B inhiba el crecimiento del cáncer hepático en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por HFD. Se espera que el Compuesto B controle la función de las células inmunitarias en el tejido tumoral, de la misma forma que el Compuesto A en el Ejemplo 1.

30 Conclusión

Se espera que el Compuesto B antagonista de EP4 inhiban el crecimiento y el desarrollo en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH coherentes con los resultados del Compuesto A del Ejemplo 1. Se espera que el tratamiento con Compuesto B del modelo en ratón aumente las frecuencias del subtipo de DC que es esencial para la respuesta inmunitaria contra el cáncer (CD103<sup>+</sup>) y disminuye la expresión de PD-1 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos en el tejido tumoral. También se espera que el tratamiento con Compuesto B disminuya la población de linfocitos Treg inmunosupresores (Foxp3<sup>+</sup>) en tejidos tumorales.

40 **Ejemplo 4:**

Se espera que el Compuesto B junto con un anticuerpo de PD-1 muestra una eficacia antitumoral superior a la del Compuesto B en solitario en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por HFD.

45 Métodos de estudio

Se usaría el mismo modelo en ratón que en el Ejemplo 3 para someter a ensayo la eficacia del Compuesto B junto con un anticuerpo de PD-1 en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por HFD. En consecuencia, Se repitió el Ejemplo 3, salvo que también se administró un anticuerpo de PD-1 con el Compuesto B en el grupo tratado con Compuesto B.

50 Resultados

Se espera que la terapia con el Compuesto B junto con el anticuerpo de PD-1 muestra una eficacia antitumoral superior a los ratones tratados con el Compuesto B del Ejemplo 3 en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por HFD.

60 **Ejemplo 5:**

Se espera que el tratamiento con el Compuesto C inhiba el crecimiento del cáncer hepático en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por HFD.

65 Métodos de estudio

Se usaría el mismo modelo en ratón que en el Ejemplo 1 para someter a ensayo la eficacia del Compuesto C. En

consecuencia, se repitió el Ejemplo 1, salvo que se usó el Compuesto C en lugar del Compuesto A.

Resultados del estudio

- 5 Se espera que la terapia con el Compuesto C inhiba el crecimiento del cáncer hepático en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por HFD. Se espera que el Compuesto C controle la función de las células inmunitarias en el tejido tumoral, de la misma forma que el Compuesto A en el Ejemplo 1.

Conclusión

- 10 Se espera que el Compuesto C antagonista de EP4 inhiban el crecimiento y el desarrollo en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH coherentes con los resultados del Compuesto A del Ejemplo 1 y los resultados esperados del Compuesto B del Ejemplo 3. Se espera que el tratamiento con Compuesto C del modelo en ratón aumente las frecuencias del subtipo de DC que es esencial para la respuesta inmunitaria contra el cáncer (CD103<sup>+</sup>) y  
15 disminuye la expresión de PD-1 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos en el tejido tumoral. También se espera que el tratamiento con Compuesto C disminuya la población de linfocitos Treg inmunosupresores (Foxp3<sup>+</sup>) en tejidos tumorales.

**Ejemplo 6:**

- 20 Se espera que el Compuesto C junto con un anticuerpo de PD-1 muestra una eficacia antitumoral superior a la del Compuesto C en solitario en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por HFD.

Métodos de estudio

- 25 Se usaría el mismo modelo en ratón que en el Ejemplo 5 para someter a ensayo la eficacia del Compuesto C junto con un anticuerpo de PD-1 en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por HFD. En consecuencia, Se repitió el Ejemplo 5, salvo que también se administró un anticuerpo de PD-1 con el Compuesto C en el grupo tratado con Compuesto C.

Resultados

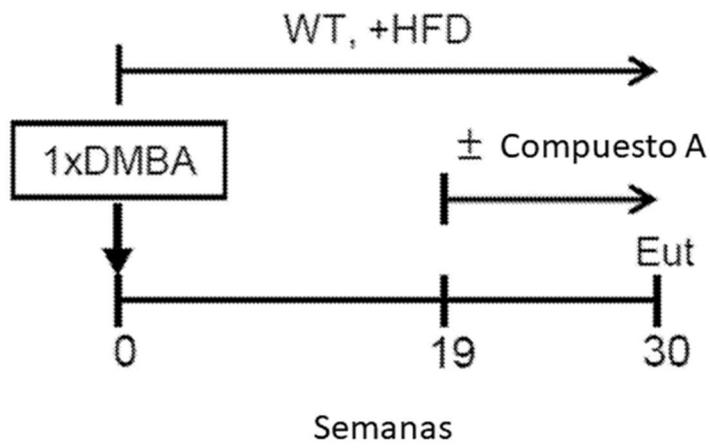
- 35 Se espera que la terapia con el Compuesto C junto con el anticuerpo de PD-1 muestra una eficacia antitumoral superior a los ratones tratados con el Compuesto C del Ejemplo 5 en un modelo de cáncer de hígado en ratón asociado a NASH inducido por HFD.

## REIVINDICACIONES

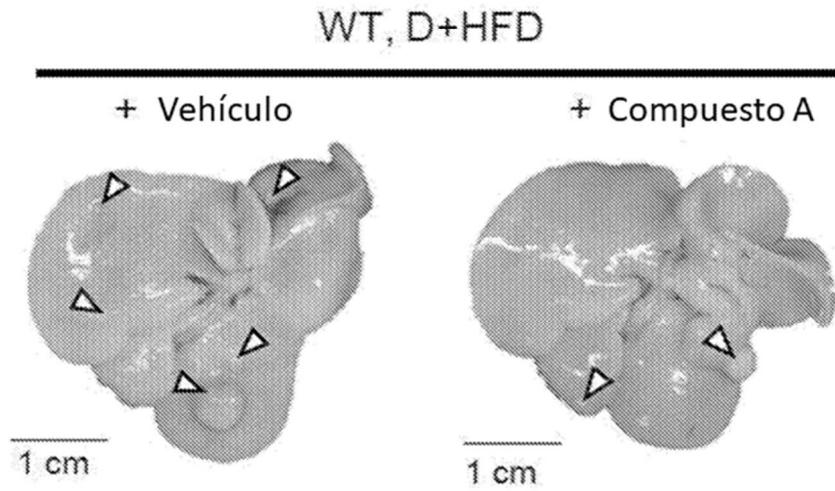
- 5 1. Un antagonista de EP4 para uso en un método para el tratamiento del cáncer de hígado asociado a NASH que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz del antagonista de EP4 a un ser humano o un animal que lo necesita.
- 10 2. El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además administrar la cantidad farmacéuticamente eficaz del antagonista de EP4 junto con un segundo principio activo, una terapia antitumoral, o ambos.
- 15 3. El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el segundo principio activo es un inhibidor del punto de control inmunitario o un inhibidor de PD-1.
4. El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el antagonista de EP4 es al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:
- 20 ácido 4-[(1S)-1-[[5-cloro-2-(3-fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil]amino]etil]benzoico (Compuesto A),  
 ácido 4-[(1S)-1-[[5-cloro-2-(4-fluorofenoxi)benzoil]amino]etil]benzoico (Compuesto B), y  
 3-[2-(4-{2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il}fenil)etil]-1-[(4-metilbenceno)sulfonil]urea (Compuesto C),  
 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 25 5. Un antagonista de EP4 para su uso en un método de terapia que se selecciona entre uno o más del grupo que consiste en:
- 30 aumentar las DC, las DC CD103<sup>+</sup>, que pueden activar la función inmunitaria antitumoral en un ser humano o un animal que lo necesita,  
 disminuir los linfocitos Treg Foxp3<sup>+</sup> que suprimen la función inmunitaria antitumoral en un ser humano o un animal que lo necesita,  
 35 aumentar la proporción de la población de linfocitos Treg/CD8<sup>+</sup> en un ser humano o un animal que lo necesita,  
 aumentar la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados (células CD69<sup>+</sup>) en un ser humano o en un animal que lo necesita, y  
 disminuir la expresión de PD-1 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> en un ser humano o en un animal que lo necesita, y  
 en donde el método comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un antagonista de EP4 para el tratamiento del cáncer de hígado asociado a NASH a un ser humano o un animal que lo necesita.
- 40 6. El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además administrar la cantidad farmacéuticamente eficaz del antagonista de EP4 junto con un segundo principio activo, una terapia antitumoral, o ambos.
- 45 7. El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el segundo principio activo es un inhibidor del punto de control inmunitario o un inhibidor de PD-1.
8. El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el antagonista de EP4 es al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:
- 50 ácido 4-[(1S)-1-[[5-cloro-2-(3-fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil]amino]etil]benzoico (Compuesto A),  
 ácido 4-[(1S)-1-[[5-cloro-2-(4-fluorofenoxi)benzoil]amino]etil]benzoico (Compuesto B), y  
 3-[2-(4-{2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il}fenil)etil]-1-[(4-metilbenceno)sulfonil]urea (Compuesto C),  
 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 55 9. Una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento del cáncer de hígado asociado aa NASH que comprende un antagonista de EP4 y un aditivo, un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptables.
- 60 10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende además un segundo principio activo y/o un anticuerpo antitumoral.
11. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, en donde el antagonista de EP4 es al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:
- 65 ácido 4-[(1S)-1-[[5-cloro-2-(3-fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil]amino]etil]benzoico (Compuesto A),  
 ácido 4-[(1S)-1-[[5-cloro-2-(4-fluorofenoxi)benzoil]amino]etil]benzoico (Compuesto B), y  
 3-[2-(4-{2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il}fenil)etil]-1-[(4-metilbenceno)sulfonil]urea (Compuesto C),  
 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

12. Un antagonista de EP4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método de tratamiento del cáncer de hígado asociado aa NASH en un ser humano o un animal.
- 5 13. El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el antagonista de EP4 se usa junto con un segundo principio activo, una terapia antitumoral, o ambos.
14. El antagonista de EP4 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13, en donde el antagonista de EP4 es al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:
- 10 ácido 4-[(1S)-1-[[5-cloro-2-(3-fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil]amino]etil]benzoico (Compuesto A),  
ácido 4-((1S)-1-[[5-cloro-2-(4-fluorofenoxi)benzoil]amino]etil]benzoico (Compuesto B), y  
3-[2-(4-{2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il}fenil)etil]-1-(4-metilbenceno)sulfonil]urea (Compuesto C),
- 15 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

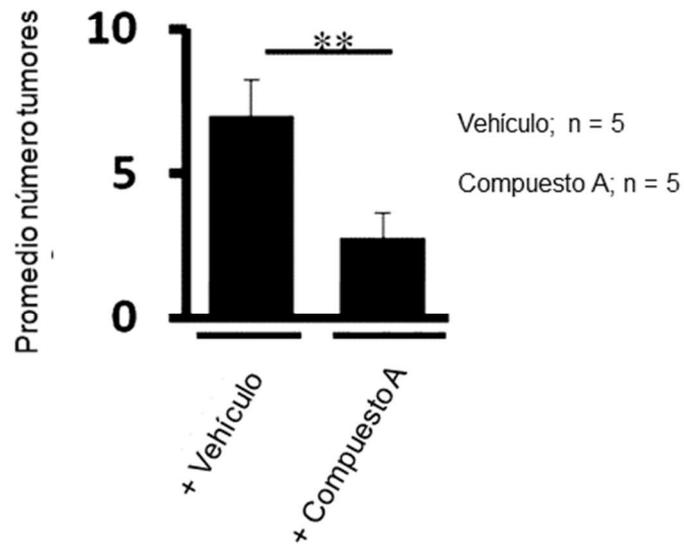
[Fig. 1]



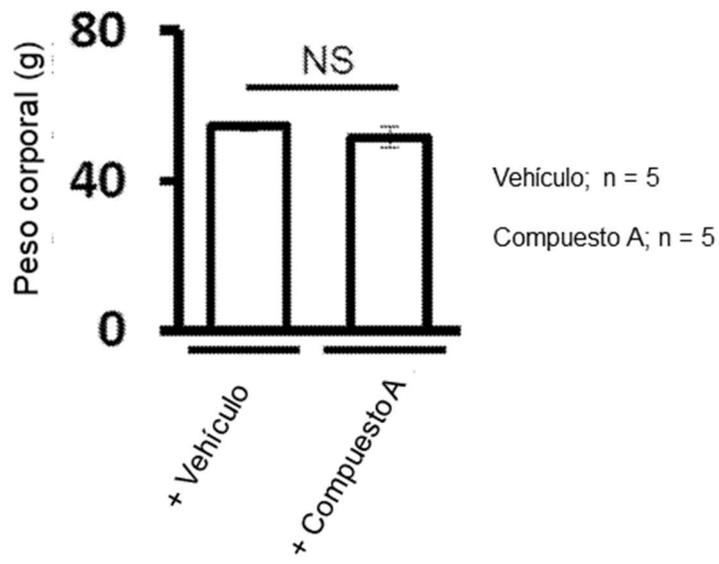
[Fig. 2]



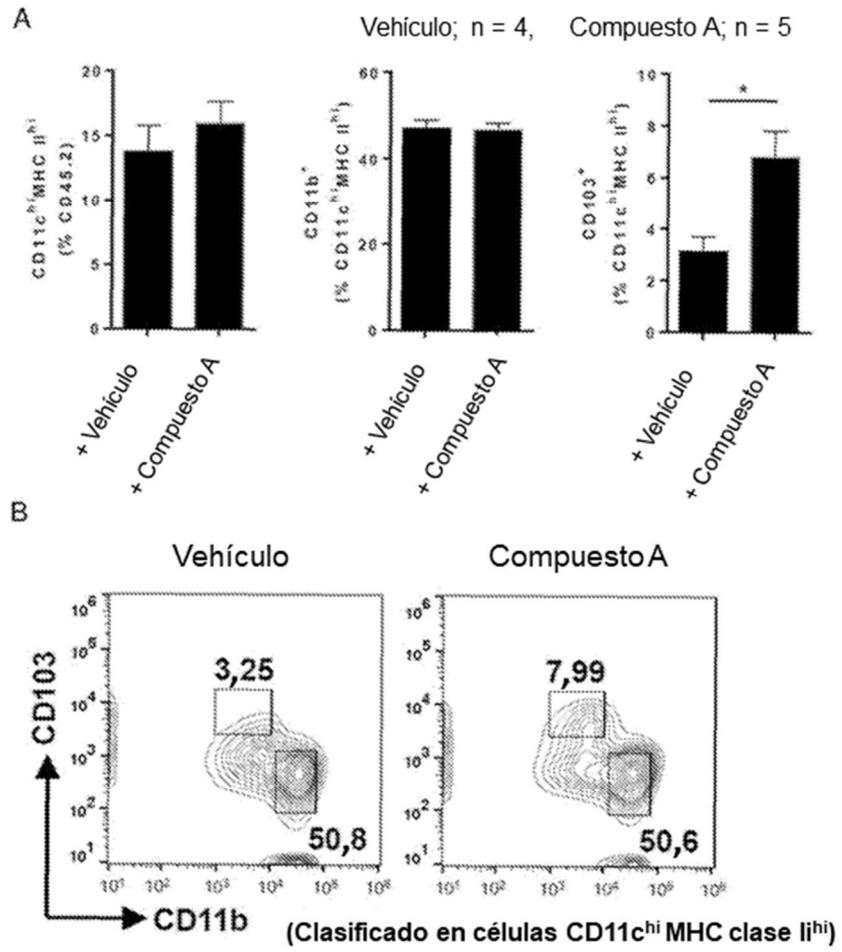
[Fig. 3]



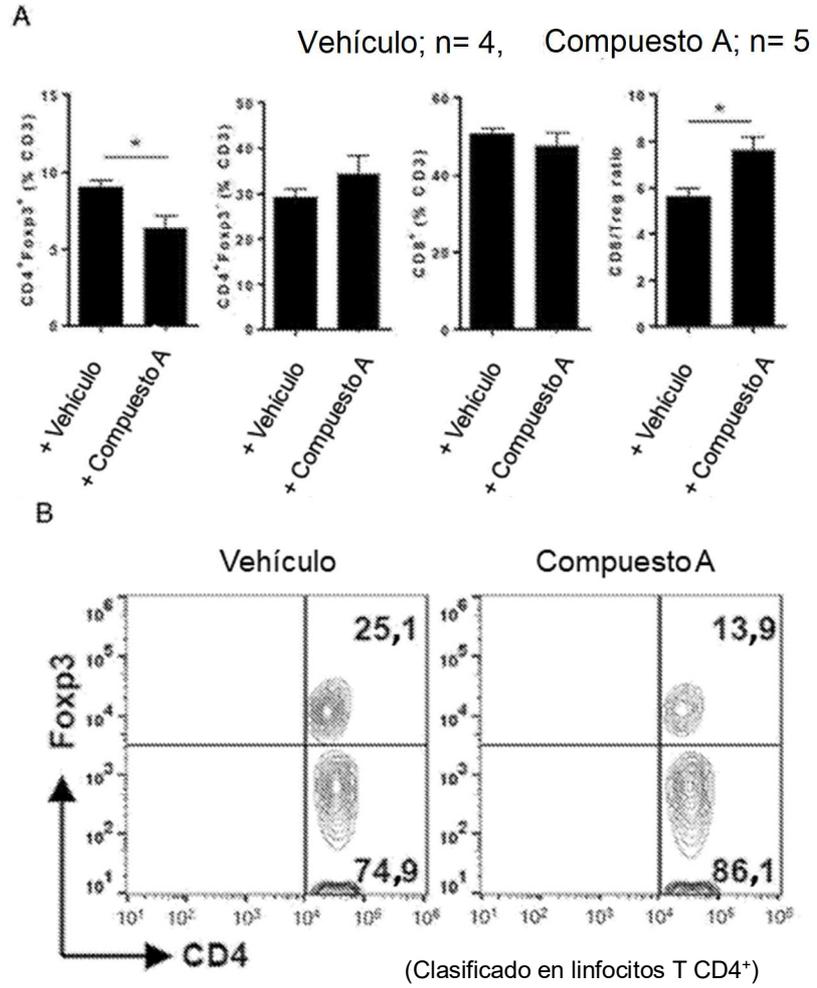
[Fig. 4]



[Fig. 5]

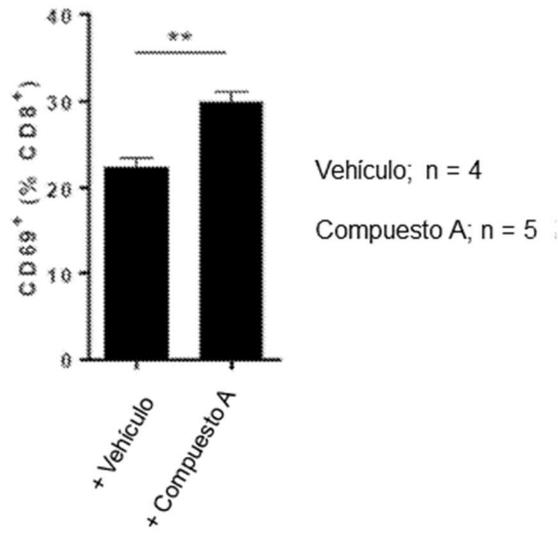


[Fig. 6]

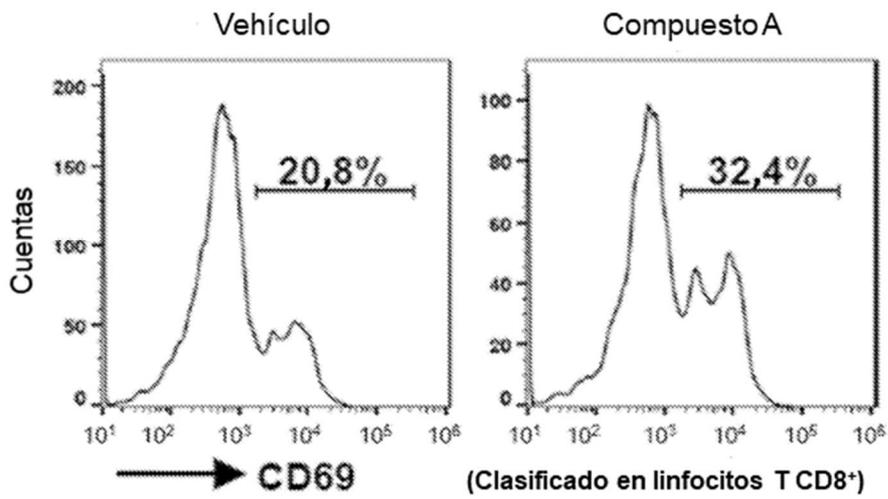


[Fig. 7]

A

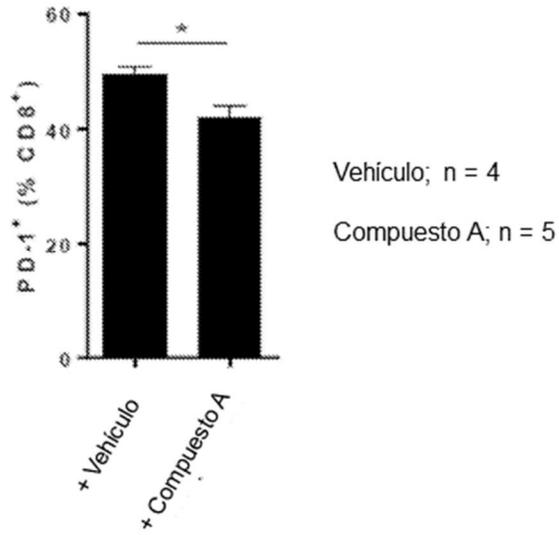


B



[Fig. 8]

A



B

