

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de publicación internacional  
**WO 2020/008097 A2**

(43) Fecha de publicación internacional  
09 de enero de 2020 (09.01.2020)

(51) Clasificación internacional de patentes:  
C12Q 1/68 (2018.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2019/070470

(22) Fecha de presentación internacional:  
03 de julio de 2019 (03.07.2019)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P201830665 03 de julio de 2018 (03.07.2018) ES  
P201830666 03 de julio de 2018 (03.07.2018) ES

(71) Solicitantes: UNIVERSIDAD DE GRANADA [ES/ES];  
Hospital Real, Avda. del Hospicio s/n, 18071 Granada (ES).

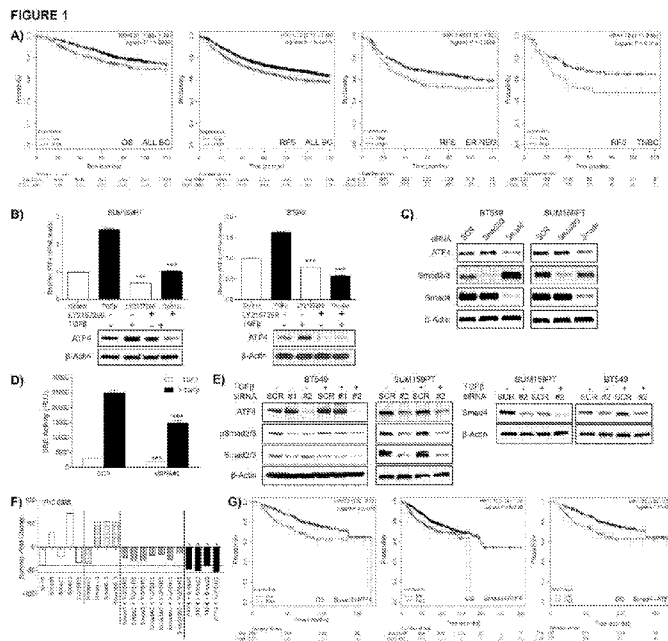
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES).

(72) Inventores: GRANADOS PRINCIPAL, Sergio; FIBAO, C/ Doctor Azpitarte 4, 4ª Planta, 18012 Granada (ES). SÁNCHEZ ROVIRA, Pedro; FIBAO, C/ Doctor Azpitarte 4, 4ª Planta, 18012 Granada (ES). RAMÍREZ TORTOSA, César; FIBAO, C/ Doctor Azpitarte 4, 4ª Planta, 18012 Granada (ES). GARCÍA CHÁVES, María Angel; FIBAO, C/ Doctor Azpitarte 4, 4ª Planta, 18012 Granada (ES). MAR-CHAL CORRALES, Juan Antonio; Universidad de Granada, Facultad de Medicina, Dpto. de Anatomía, Anatomía y Embriología Humana, 18071 Granada (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK,

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING DATA THAT CAN BE USED FOR THE PREDICTION OR PROGNOSIS OF OVERALL SURVIVAL AND RELAPSE-FREE SURVIVAL FROM CANCER, AND COMPOSITION THAT CAN MODULATE THE ACTIVITY OF ATF4 FOR THE TREATMENT OF CANCER

(54) Título: MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA PREDECIR O PRONOSTICAR LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECAÍDAS EN EL CÁNCER Y COMPOSICIÓN CAPAZ DE MODULAR LA ACTIVIDAD DE ATF4 PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER



(57) Abstract: The present invention relates to an in vitro method of obtaining data that can be used for the prediction or prognosis of overall survival and relapse-free survival from cancer, preferably breast cancer. In addition, the present invention relates to a composition that can modulate the activity of ATF4 for the treatment of cancer.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un método in vitro de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la supervivencia global y la supervivencia libre de recaídas en el cáncer, preferiblemente cáncer de mama. Además, la presente invención se



WO 2020/008097 A2

DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

**(84) Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))*
- *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

## MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA PREDECIR O PRONOSTICAR LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECAÍDAS EN EL CÁNCER Y COMPOSICIÓN CAPAZ DE MODULAR LA ACTIVIDAD DE ATF4 PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

### 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra dentro del campo de la Biología Molecular y la Medicina Clínica. Específicamente, se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la supervivencia global y la supervivencia libre de recaídas en el cáncer, preferiblemente cáncer de mama. Además, la presente invención se refiere a una composición  
10 capaz de modular la actividad de la ATF4 para el tratamiento del cáncer, y más específicamente para el tratamiento del cáncer de mama. También se refiere a un método de selección de fármacos útiles en el tratamiento de cáncer y a un método para la recolección de datos útiles en el diagnóstico de dichas enfermedades.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El cáncer de mama es la principal causa de muerte relacionada con el cáncer en el mundo para las mujeres. Es el tumor más frecuente en las mujeres occidentales, y en España se diagnostican alrededor de 25.000 nuevos cánceres de mama al año. La detección temprana y el tratamiento mejoran el pronóstico y la tasa de supervivencia, lo que motiva la necesidad de descubrir nuevos métodos no invasivos para el diagnóstico precoz de esta enfermedad. En la actualidad, la biopsia  
20 que confirma el diagnóstico y los diferentes grados de cáncer, al tratarse de un método invasivo, lleva mucho tiempo y, a menudo, es incómodo para el paciente.

Además, la tasa de biopsia negativa es significativamente alta, especialmente en cánceres detectados y no palpables que sugieren que se necesitan mejores técnicas de diagnóstico molecular para reemplazar o complementar las técnicas actuales de biopsia. La caracterización  
25 tisular por los patólogos para ER, PR y el estado HER 2/ Neu y el estado de los ganglios linfáticos axilares son los factores pronósticos más importantes y el 90% de los pacientes sin compromiso ganglionar no tienen más cánceres de mama detectados en su vida.

Por lo tanto, es imperativo encontrar nuevos biomarcadores para el diagnóstico precoz y preciso y el pronóstico en el cáncer de mama, evitando que la mayoría de los pacientes se sometan a  
30 una disección axilar. Dichas firmas moleculares también pueden conducir a un buen pronóstico y ayudar a desarrollar nuevos tratamientos dirigidos. Además, este enfoque puede identificar con precisión los subgrupos de pacientes que realmente se beneficiarán de la quimioterapia citotóxica con sus efectos secundarios debilitantes.

- Por otro lado, el cáncer de mama es el cáncer más diagnosticado y se asocia con una incidencia y una tasa de mortalidad elevadas en mujeres. El cáncer de mama triple negativo (TNBC) es una forma muy agresiva de cáncer de mama que es negativo para los receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y HER2, con una tasa de supervivencia baja dentro de los tres años posteriores a la cirugía. TNBC (*Triple-Negative Breast Cancer*) se caracteriza por ser altamente proliferativo, heterogéneo, metastásico y resistente a los fármacos, lo que aumenta la incidencia de recaídas, y tiene enriquecidas las vías de señalización relacionadas con la agresividad como TGF $\beta$ , mTOR o Wnt. Aunque se están estudiando muchos medicamentos, no existe una terapia dirigida aprobada para el tratamiento de TNBC.
- 10 Bajo condiciones de estrés que incluyen hipoxia, privación de nutrientes, infección viral o estrés del retículo endoplásmico (ERS), las células activan la respuesta de estrés integrada (ISR) para preservar la homeostasis. La activación del ISR conduce a una síntesis de proteína global reducida mediante la fosforilación del eukaryotic translation initiation factor 2 alpha (eIF2 $\alpha$ ), que dirige la expresión del Activating Transcription Factor 4 (ATF4) para regular el destino celular. La
- 15 fosforilación de eIF2 $\alpha$  es iniciada por cuatro eIF2 $\alpha$  quinasas diferentes, denominadas Protein kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK), General Control Nonderepressible 2 (GCN2), Protein Kinase doublestranded RNA-dependent (PKR) y Heme-Regulated Inhibitor (HRI) en respuesta a ERS, privación de aminoácidos, infección viral y deficiencia de hemo, respectivamente.
- 20 En conjunto, estos factores describen la necesidad de terapias dirigidas nuevas o mejoradas, para estratificar los tumores en subgrupos moleculares o que responden al tratamiento con nuevos biomarcadores de pronóstico, y para describir nuevas dianas terapéuticas con las que garantizar una terapia personalizada efectiva.

## 25 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1. La expresión de ATF4 se correlaciona con una pobre supervivencia del paciente y una ruta de TGF $\beta$  Smad dependiente.** **A)** Kaplan-Meier muestra que una alta expresión de ATF4 se correlaciona con una peor supervivencia general (OS) en todos los pacientes con cáncer de mama (n=1402) y supervivencia libre de recaída (RFS) en todos (todos BC, n=3951),
- 30 receptores de estrógenos negativos (ER-, n=801) y pacientes con cáncer de mama triple negativo (TNBC, n=255). El umbral de seguimiento se estableció en 10 años. **B)** RT-PCR y Western Blot de ATF4 en células BT549 y SUM159PT tratadas con TGF $\beta$ 1 (10 ng/ml), LY2157299 (5  $\mu$ M) y combinación durante 72 h. El inhibidor se añadió 1 h antes que TGF $\beta$ 1. **C)** Western Blot de ATF4 en células BT549 y SUM159PT transfectadas con siRNA para Smad2/3 y Smad4. TGF $\beta$ 1 se
- 35 añadió 48 horas antes de la transfección y durante 72 horas después de la transfección. **D)**

Ensayo del informador SBE (Elemento de unión a SMAD) en células SBE-HEK293 después de la desactivación de ATF4 con/sin TGFβ1 durante 24 h. RLU: unidades de luz relativa. **E)** Efecto de la desactivación de ATF4 y el tratamiento con TGFβ1 durante 24 h y 72 h en Smad2/3 y Smad4, respectivamente. Dos siRNA dirigidos para ATF4 (siRNA#1 y siRNA#2) se usaron en BT549. siRNA#2 fue el más eficiente y luego se utilizó en células SUM159PT. **F)** Cambios en la OS de pacientes con cáncer de mama cuando ATF4 (n=1402), Smad2 (n=626), Smad3 (n=1402), Smad4 (n=626) y TGFBR1 (n=626) se expresan solos o coexpresados. Survival Fold Change se probó mediante la corrección de múltiples pruebas (\* P <0.0038). **G)** Kaplan-Meier muestra la OS de pacientes con cáncer de mama cuando ATF4 se coexpresa con Smad2, Smad3 o Smad4. HR: Hazard Ratio. \*\*\* P <0.001.

**Figura 2. El silenciamiento de ATF4 inhibe las propiedades metastáticas y proliferativas de las células tumorales y se correlaciona con una menor expresión de EMT y marcadores pro-supervivencia. A)** Migración y **B)** invasión de células BT549, SUM159PT y MDA-MB-231 después de la caída de ATF4 con/sin TGFβ1. **C)** Cambios en la expresión de proteínas de los marcadores de EMT (N-cadherina, Zeb1, Snail, Slug, Twist1) después del silenciamiento de ATF4 en células BT549, SUM159PT y MDA-MB-231 con y sin TGFβ1 durante 24 h. **D)** Proliferación después de la caída de ATF4 con/sin TGFβ1 durante 24 h (MDA-MB-231 se trataron durante 72 h). **E)** Análisis de Western Blot de proteínas pro-supervivencia (Bcl2 y Mcl1) después de la transfección con siRNA#2 para ATF4 y 72 h con TGFβ1.

**Figura 3. La formación de mamo esferas disminuye después de la caída de ATF4 y se correlaciona con una menor expresión de marcadores de origen. A)** Aumento de la expresión de la proteína ATF4 en generaciones primarias y secundarias de mamo esferas (MS) en comparación con las células unidas (Att). **B)** Eficiencia de formación de mamesfera (MSFE) en tres líneas celulares de TNBC después de la inhibición de ATF4 y TGFβ1 durante 24 h. **C)** Expresión de ARNm de Nanog, Sox2, Oct4, Notch1 y Cxcl10 tras la caída de ATF4 con TGFβ1 durante 72 h. **D)** Western blot de marcadores de pluripotencialidad después del silenciamiento de ATF4 y el tratamiento con TGFβ1 durante 24 h (BT549, MDA-MB-231) y 72 h (SUM159PT).

**Figura 4. El direccionamiento de ATF4 reduce las metástasis a hígado y pulmones en un modelo PDX de cáncer de mama. A)** Niveles de ARNm de ATF4 en 20 modelos diferentes de PDX de TNBC mediante secuenciación de ARN. **B)** Imágenes representativas y porcentaje de ratones (n=5/grupo) con metástasis en hígado y **C)** pulmones, respectivamente, después del tratamiento con siRNA#2 para ATF4 y SCR (control) durante 6 semanas. **D)** Evaluación inmunohistoquímica de metástasis a hígado y pulmones por Ki67.

**Figura 5. La inhibición de ATF4 retrasa el crecimiento del tumor PDX, la población de células madre cancerígenas, la recaída tumoral y amplía la supervivencia después del tratamiento. A)** Volumen de tumores BCM-3887 (n = 8 / grupo) tratados con SiRNA n. ° 2 para

ATF4 y control (SCR) con y sin docetaxel (20 mg / kg). **B)** Análisis de citometría de flujo de la población de células positivas para Aldefluor después de la caída de ATF4 con / sin docetaxel en tejido BCM-3387 PDX. **C)** Volumen de tumores BCM-4664 (n = 8 / grupo) tratados con siRNA n. ° 2 y SCR. El co-tratamiento de siRNAs con docetaxel (33mg / kg) durante 6 semanas se utilizó para estudiar la recaída tumoral después de los tratamientos. **D)** Población de células positivas a Aldefluor después de la caída de ATF4 en tumores BCM-4664 PDX. **E)** Curva de Kaplan-Meier de supervivencia media post-tratamiento de ratones portadores de tumores BCM-4664 PDX después de la caída de ATF4 en combinación con docetaxel (33 mg / kg), P = 0,0001. **F)** Western blot y análisis densitométrico que muestran la eficacia de knockdown de ATF4 en los tejidos tumorales BCM-3387 y BCM-4664. \* P <0.05, \*\* P <0.01, \*\*\* P <0.001.

**Figura 6. ATF4 actúa cadena abajo de mTORC2 bajo tratamiento con TGFβ. Potencial pronóstico de una firma genética basada en mecanismos en pacientes con cáncer de mama.** **A)** Transferencia de Western de ATF4 en células transfectadas (24 h) con SiRNA para mediadores típicos de respuesta de estrés integrado (ISR) y tratadas con TGFβ1 durante 72 h. **B)** Niveles de proteína ATF4 después de la precipitación de Raptor y Rictor tratados con TGFβ1 durante 72 h (SUM159PT, BT549) o 24 h (MDA-MB-231). ARNsi para TAK1 también se probó en SUM159PT. **C)** Cambio en la expresión de Snail por siRNAs para Raptor y Rictor en tres líneas celulares tratadas con TGFβ1 durante 24 h. **D)** La correlación de Pearson de la expresión del ARNm de ATF4 (niveles de intensidad logarítmica) con los componentes de la señalización de mTORC2 y mTORC1 en una cohorte de 2509 pacientes con cáncer de mama. **E)** Transferencia de Western de dianas aguas abajo de mTORC2 y mTORC1 en células transfectadas con SiRNA para ATF4 y tratadas con TGFβ1 durante 72 h (se realizó un tratamiento de 24 horas en SUM159PT para analizar los dianas mTORC1). **F)** Esquema que muestra las rutas de señalización que activan ATF4 tras la activación de TGFβ y las retroalimentaciones positivas detectadas. **G)** Valor pronóstico (cambio de pliegues de RFS) de la firma de ocho genes frente a cada gen único en todos (todos los BC) y pacientes con ER- con cáncer de mama. Survival Fold Change se probó mediante la corrección de múltiples pruebas (\* P <0,005) y la validación cruzada de dejar salir. **H)** Impacto de la firma de ocho genes en la supervivencia de pacientes con cáncer de mama con alteraciones en el ADN (amplificación, delección) y ARN (expresión) de cada gen. Cada gen fue probado valiéndose de validación cruzada.

**Figura suplementaria 1. La alta expresión de ATF4 se correlaciona con una peor supervivencia del paciente en diferentes bases de datos.** **A)** Kaplan-Meier muestra que una alta expresión de ATF4 se correlaciona con una peor supervivencia libre de recaída (RFS) en pacientes con cáncer de mama positivo para receptores de estrógenos (ER +, n = 2061). El umbral de seguimiento se estableció en 10 años. **B)** En "Esserman: base de datos, ATF4 expresión triple negativo pacientes con cáncer de mama (TNBC) en comparación con no TNBC

(n = 98) se correlaciona con menos global (OS) supervivencia libre de recaída (RFS) en pacientes con cáncer de mama. **C)** La expresión de ATF4 en TNBC se correlaciona con una pobre supervivencia libre de metástasis en "Minn 2" (n = 81) y "Hatzis" (n = 497) frente a no TNBC. El umbral de seguimiento se estableció en 6 años en "Minn 2".

- 5 **Figura suplementaria 2. Eficacia objetivo del SiRNA de ATF4, migración después de la desactivación de ATF4 y expresión de ATF4 en mammosferas.** **A)** Eficiencia de dos secuencias de SiRNA en los niveles de ARNm de ATF4 en células SUM159PT y BT549 durante 48 horas tratadas o no con TGFβ1 durante 24 h. **B)** Imágenes representativas del "ensayo de cicatrización de heridas" después de la depleción de ATF4 en células SUM159PT, BT549 y MDA-MB-231. **C)** Niveles de proteína ATF4 en mammosferas en comparación con células unidas a las 24, 48, 72 y 96 horas en células SUM159PT y MDA-MB-231.

- Figura suplementaria 3. Suplemento de vías moleculares no canónicas y análisis OncoPrint de la firma de ocho genes.** **A)** Expresión de ATF4 en el cribado inicial con inhibidores farmacológicos U0126 (MEK1 / 2), BKM120 (PI3K), SB203580 (p38-MAPK), (5Z)-7-Oxozeaenol (TAK1) en células SUM159PT y BT549 co-tratadas con TGFβ1 por 24h. **B)** Niveles de ATF4 en una exploración más profunda de la vía de señalización de PI3K con inhibidores farmacológicos BKM120, GSK2334470 (PDK1), GSK690693 (pan-Akt), rapamicina (mTOR), CHIR-99021 (GSK3α / β), BI-D1870 (pan-RSK), GSK650394 (SGK1 / 2), ISRIB (eIF2B / ATF4, respuesta de estrés integrada) en células SUM159PT, BT549 y MDA-MB-231 co-tratadas con TGFβ1 durante 24 y 72 h. **C)** Disminución de los niveles de ATF4 en SUM159PT, BT549 y MDA-MB-231 tratados con LY294002 (inhibidor de PI3K) con TGFβ1 durante 24 y 72 h. **D)** Western blot que muestra la expresión de ATF4 en células SUM159PT y BT549 después de la destrucción de Ras durante 48 h con / sin TGFβ1 durante 72 h. **E)** Niveles de proteína de RhoA y Rac1 en SUM159PT, BT549 y MDA-MB-231 después de la inhibición de ATF4 con / sin TGFβ1 en diferentes puntos de tiempo. **F)** Porcentaje de alteraciones (amplificación, delección profunda, regulación hacia arriba y hacia abajo del ARNm) en los genes ATF4, TGFBR1, SMAD4, PIK3CA, RPTOR, EIF4EBP1, RICTOR y NDRG1 en una cohorte de 2509 pacientes con cáncer de mama de OncoPrint.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

### *USO DEL MARCADOR ATF4 PARA PREDECIR O PRONOSTICAR LA SUPERVIVENCIA DE PACIENTES CON CANCER DE MAMA*

Los autores de la presente invención han demostrado que aquellos pacientes con cáncer de mama que presentan una expresión de ATF4 igual o mayor de 7321, que se corresponde aproximadamente con el cuartil alto de expresión (rango de expresión de la sonda/gen 200779\_at en estos pacientes es de aproximadamente 2601 – 13519), presentan una menor supervivencia global.

También han visto que en términos de supervivencia libre de recaídas, todos aquellos pacientes con cáncer de mama, sin distinción de subtipos, que presenten una expresión de ATF4 igual o mayor de 7025, que se corresponde aproximadamente con el tercil alto de expresión (rango de expresión de la sonda/gen 200779\_at en estos pacientes es de aproximadamente 1033 - 25273),  
5 presentan una menor supervivencia libre de recaídas.

A su vez han demostrado que, si estratificamos por subtipos, aquellos pacientes con cáncer de mama positivo para receptor de estrógeno (ER+) que presenten una expresión de ATF4 igual o mayor de 6733 (se corresponde con aproximadamente el tercil alto de expresión. Rango de expresión de la sonda/gen 200779\_at en estos pacientes es de aproximadamente 1403 - 17883),  
10 cáncer de mama negativo para receptor de estrógenos (ER-) que presenten una expresión de ATF4 igual o mayor de 8282 (se corresponde con aproximadamente el cuartil alto de expresión. Rango de expresión de la sonda/gen 200779\_at en estos pacientes es de aproximadamente 1592 - 25273), y cáncer de mama triple negativo que presenten una expresión de ATF4 igual o mayor de 8346 (se corresponde con aproximadamente el cuartil alto de expresión. Rango de  
15 expresión de la sonda/gen 200779\_at en estos pacientes es de aproximadamente 2601 - 13519), presentan una menor supervivencia libre de recaídas.

Sin embargo, la expresión de ATF4 en pacientes con cáncer de mama HER2 (rango de expresión de la sonda/gen 200779\_at: 1592 - 17543) no se correlaciona con una menor supervivencia libre de recaídas.

20 Por tanto, un primer **aspecto** de la invención se refiere al uso de ATF4 para predecir o pronosticar la supervivencia global en un individuo con cáncer.

Preferiblemente el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de hígado, carcinoma esofágico de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo.

25 Más preferiblemente es cáncer de mama, y aún más preferiblemente es cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo.

Otro **aspecto** de la invención se refiere al uso de ATF4 para predecir o pronosticar la supervivencia libre de recaídas en un individuo con cáncer.

Preferiblemente el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de hígado, carcinoma esofágico de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo.

30 Más preferiblemente es cáncer de mama, y aún más preferiblemente es cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo.

El término "ATF4" (también llamado en la literatura CREB2; TXREB; CREB-2; TAXREB67) se refiere a un el gen codifica un factor de transcripción que se identificó originalmente como una proteína de unión a ADN de mamífero ampliamente expresada que podría unirse a un elemento potenciador de respuesta tributaria en el LTR de HTLV-1. La proteína codificada también se aisló y caracterizó como la proteína 2 de unión al elemento de respuesta de cAMP (CREB-2). La proteína codificada por este gen pertenece a una familia de proteínas de unión al ADN que incluye la familia de factores de transcripción AP-1, proteínas de unión al elemento de respuesta de cAMP (CREB) y proteínas de tipo CREB. Estos factores de transcripción comparten una región de cremallera de leucina que está involucrada en las interacciones proteína-proteína, localizada en C-terminal a un tramo de aminoácidos básicos que funciona como un dominio de unión de ADN. Se han descrito dos transcripciones alternativas que codifican la misma proteína. Dos pseudogenes están ubicados en el cromosoma X a q28 en una región que contiene una gran duplicación invertida.

A no ser que se indique lo contrario, cuando se utiliza en el presente documento el término "ATF4", se refiere tanto al gen como a la proteína ATF4 humana. En el contexto de la presente invención, ATF4 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína ATF4, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético, d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2. en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ATF4. Entre otras posibles secuencias nucleotídicas que codifican ATF4 se encuentra, pero sin limitarse, la SEQ ID NO: 1

*USO DE LA FIRMA DE EXPRESION GÉNICA COMPUESTA POR TGFBR1, SMAD4, PIK3CA, RPTOR, RICTOR, NDRG1, EIF4EBP1 y/o ATF4 PARA PREDECIR O PRONOSTICAR LA SUPERVIVENCIA DE PACIENTES CON CANCER DE MAMA*

Los autores de la presente invención han empleado las siguientes sondas para cada uno de los genes componentes de la firma génica: 224793\_s\_at (TGFBR1), 235725\_at (SMAD4), 204369\_at (PIK3CA), 225715\_at (RPTOR), 226312\_at (RICTOR), 200632\_s\_at (DRG1), 221539\_at (EIF4EBP1), 200779\_at (CREB-2)

Para computar los rangos de expresión, se parte de la expresión media de cada sonda/gen.

Los autores han visto que, en términos de supervivencia libre de recaídas, todos aquellos pacientes con cáncer de mama, sin distinción de subtipos, que presenten una expresión media del conjunto de dichas sondas igual o mayor de 1546.75, que se corresponde aproximadamente con el cuartil bajo de expresión (rango de expresión media del conjunto de sondas en estos 5 pacientes es 725 - 6631), presentan una menor supervivencia libre de recaídas.

Por otro lado, la expresión media de dichos genes igual o mayor a 1838.62 (que se corresponde aproximadamente con el tercil bajo de expresión) se correlaciona con una menor supervivencia libre de recaídas en pacientes con cáncer de mama ER- (rango de expresión media del conjunto 10 de genes en estos pacientes es 1183 - 5732).

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1*, *EIF4EBP1*, y/o *ATF4*, o cualquiera de sus combinaciones para predecir o pronosticar la supervivencia libre de recaídas en un individuo con cáncer.

Preferentemente, la invención se refiere al uso de *ATF4* y al menos uno de los genes 15 seleccionados del grupo que consiste en *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1* y *EIF4EBP1*.

En una realización preferida se emplean la firma génica que comprende *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1*, *EIF4EBP1* y *ATF4* simultáneamente.

Preferiblemente el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de páncreas, cáncer 20 de pulmón de células no pequeñas, cáncer de hígado, carcinoma esofágico de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo. Más preferiblemente es cáncer de mama, y aún más preferiblemente es cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo.

El término "TGFBR1" (también llamado en la literatura AAT5; ALK5; ESS1; LDS1; MSSE; SKR4; 25 TBRI; ALK-5; LDS1A; LDS2A; TBR-i; TGFR-1; ACVRLK4; tbetaR-I) se refiere a un el gen codifica una proteína que forma un complejo heteromérico con receptores de TGF-beta tipo II cuando se une a TGF-beta, transduciendo la señal de TGF-beta desde la superficie de la célula al citoplasma. La proteína codificada es una serina/treonina proteína quinasa. Las mutaciones en este gen se han asociado con el síndrome de aneurisma aórtico Loews-Dietz (LDAS). Se han 30 encontrado múltiples variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas para este gen.

A no ser que se indique lo contrario, cuando se utiliza en el presente documento el término "TGFBR1", se refiere tanto al gen como a la proteína humana. En el contexto de la presente invención, "TGFBR1" se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que

constituye la secuencia codificante de la proteína "TGFBR1", y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 4,
- 5 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la  
10 SEQ ID NO: 4. en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína TGFBR1. Entre otras posibles secuencias nucleotídicas que codifican TGFBR1 se encuentra, pero sin limitarse, la SEQ ID NO: 3.

Gene ID: 7046. Localización del gen: 9q22.33

- 15 El término " SMAD4" (también llamado en la literatura JIP; DPC4; MADH4; MYHRS) se refiere a un gen que codifica un miembro de la familia Smad de proteínas de transducción de señales. Las proteínas Smad se fosforilan y activan mediante transmembrana serina-treonina quinasas receptoras en respuesta a la señalización del factor de crecimiento transformante (TGF)-beta. El producto de este gen forma complejos homoméricos y complejos heteroméricos con otras  
20 proteínas Smad activadas, que luego se acumulan en el núcleo y regulan la transcripción de genes diana. Esta proteína se une al ADN y reconoce una secuencia palindrómica de 8 pb (GTCTAGAC) llamada elemento de unión Smad (SBE). La proteína actúa como un supresor tumoral e inhibe la proliferación de células epiteliales. También puede tener un efecto inhibitorio sobre los tumores al reducir la angiogénesis y aumentar la hiperpermeabilidad de los vasos  
25 sanguíneos. La proteína codificada es un componente crucial de la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea. Las proteínas Smad están sujetas a una regulación compleja mediante modificaciones postraduccionales. Se ha demostrado que las mutaciones o deleciones en este gen dan como resultado cáncer de páncreas, síndrome de poliposis juvenil y síndrome de telangiectasia hemorrágica hereditaria.
- 30 A no ser que se indique lo contrario, cuando se utiliza en el presente documento el término "SMAD4", se refiere tanto al gen como a la proteína humana. En el contexto de la presente invención, "SMAD4" se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína "SMAD4", y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 6,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- 5 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 6. en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad
- 10 y las características estructurales de la proteína *SMAD4*. Entre otras posibles secuencias nucleotídicas que codifican *SMAD4* se encuentra, sin limitarse, la SEQ ID NO: 5.

Gene ID: 4089 Localización del gen: 18q21.2

El término " *PIK3CA*" (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*, también llamado en la literatura MCM; CWS5; MCAP; PI3K; CLOVE; MCMTC; PI3K-alpha; p110-

15 alpha) se refiere a una proteína, la fosfatidilinositol 3-quinasa, que está compuesta por una subunidad reguladora de 85 kDa y una subunidad catalítica de 110 kDa. La proteína codificada por este gen representa la subunidad catalítica, que usa ATP para fosforilar PtdIns, PtdIns4P y PtdIns (4,5) P2. Se ha encontrado que este gen es oncogénico y ha sido implicado en cánceres de cuello uterino. Un pseudogen de este gen se ha definido en el cromosoma 22.

20 A no ser que se indique lo contrario, cuando se utiliza en el presente documento el término "*PIK3CA*", se refiere tanto al gen como a la proteína humana. En el contexto de la presente invención, "*PIK3CA*" se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína "*PIK3CA*", y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- 25 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 8,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del
- 30 código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 8. en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad

y las características estructurales de la proteína *PIK3CA*. Entre otras posibles secuencias nucleotídicas que codifican *PIK3CA* se encuentra, pero sin limitarse, la SEQ ID NO: 7.

Gene ID: 5290. Localización del gen: 3q26.32

5 El término "RPTOR" (*regulatory associated protein of MTOR, complex 1*, también llamado en la literatura KOG1; Mip1) es un gen que codifica un componente de una ruta de señalización que regula el crecimiento celular en respuesta a los niveles de nutrientes e insulina. La proteína codificada forma un complejo estequiométrico con la mTOR quinasa y también se asocia con la proteína de unión al factor 4E eucariótico y la proteína S6 quinasa ribosómica. La proteína regula positivamente la proteína S6 quinasa ribosómica efector corriente abajo y regula negativamente  
10 la mTOR quinasa. Se han encontrado múltiples variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas para este gen.

A no ser que se indique lo contrario, cuando se utiliza en el presente documento el término "RPTOR", se refiere tanto al gen como a la proteína humana. En el contexto de la presente invención, "RPTOR" se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que  
15 constituye la secuencia codificante de la proteína "RPTOR", y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 10,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia  
20 polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la  
25 SEQ ID NO: 10. en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína *RPTOR*. Entre otras posibles secuencias nucleotídicas que codifican *RPTOR* se encuentra, sin limitarse, la SEQ ID NO: 9.

Gene ID: 57521 Localización del gen: 17q25.3

30 El término "RICTOR" (*RPTOR independent companion of MTOR complex 2*, también llamado en la literatura PIA; AVO3; hAVO3). RICTOR y MTOR (FRAP1; MIM 601231) son componentes de un complejo proteico que integra señales derivadas de nutrientes y factores de crecimiento para regular el crecimiento celular.

A no ser que se indique lo contrario, cuando se utiliza en el presente documento el término "RICTOR", se refiere tanto al gen como a la proteína humana. En el contexto de la presente invención, "RICTOR" se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína "RICTOR", y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 12,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 12. en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína RICTOR. Entre otras posibles secuencias nucleotídicas que codifican RICTOR se encuentra, sin limitarse, la SEQ ID NO: 11.

Gene ID: 253260. Location: 5p13.1

El término " NDRG1" (*N-myc downstream regulated 1*, también llamado en la literatura GC4; RTP; DRG1; NDR1; NMSL; TDD5; CAP43; CMT4D; DRG-1; HMSNL; RIT42; TARG1; PROXY1).

Este gen es un miembro de la familia de genes regulados negativamente N-myc que pertenece a la superfamilia alfa / beta hidrolasa. La proteína codificada por este gen es una proteína citoplasmática involucrada en respuestas de estrés, respuestas hormonales, crecimiento celular y diferenciación. La proteína codificada es necesaria para la activación y apoptosis de la caspasa mediada por p53. Las mutaciones en este gen son una causa de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4D, y la expresión de este gen puede ser un indicador de pronóstico para varios tipos de cáncer. Alternativamente se han observado variantes de transcrito que codifican múltiples isoformas para este gen.

A no ser que se indique lo contrario, cuando se utiliza en el presente documento el término "NDRG1", se refiere tanto al gen como a la proteína humana. En el contexto de la presente invención, "NDRG1" se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína "NDRG1", y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 14,

- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- 5 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 14. en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína *NDRG1*. Entre otras posibles secuencias nucleotídicas que codifican *NDRG1* se encuentra, sin limitarse, la SEQ ID NO: 13.
- 10 Gene ID: 10397. Location: 8q24.22
- El término "*EIF4EBP1*" (*eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*, también llamado en la literatura BP-1; 4EBP1; 4E-BP1; PHAS-I). Este gen codifica un miembro de una familia de proteínas represoras de la traducción. La proteína interactúa directamente con el factor de iniciación de traducción eucariótico 4E (eIF4E), que es un componente limitante del complejo
- 15 multisubunidad que recluta subunidades ribosómicas 40S al extremo 5 'de los ARNm. La interacción de esta proteína con eIF4E inhibe el ensamblaje complejo y reprime la traducción. Esta proteína se fosforila en respuesta a varias señales que incluyen irradiación UV y señalización de insulina, lo que resulta en su disociación de eIF4E y la activación de la traducción de ARNm.
- 20 A no ser que se indique lo contrario, cuando se utiliza en el presente documento el término "*EIF4EBP1*", se refiere tanto al gen como a la proteína humana. En el contexto de la presente invención, "*EIF4EBP1*" se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína "*EIF4EBP1*", y que comprendería diversas variantes procedentes de:
- 25 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 16,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del
- 30 código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 16. en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la

actividad y las características estructurales de la proteína *EIF4EBP1*. Entre otras posibles secuencias nucleotídicas que codifican *EIF4EBP1* se encuentra, sin limitarse, la SEQ ID NO: 15.

Gene ID: 1978. Location: 8p11.23

#### MÉTODOS DE LA INVENCION

5 Otro **aspecto** de la invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la supervivencia global en un individuo con cáncer, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

a) obtener una muestra biológica aislada del individuo,

b) detectar el producto de expresión de ATF4

10 Preferiblemente se detectan los niveles de expresión, bien de la proteína, o bien del ARNm que lo codifica.

En una realización preferida de este aspecto el primer método de la invención además comprende

c) asignar a dicho individuo al grupo de individuos con una menor supervivencia global cuando  
15 ATF4 presenta una expresión superior, o sobreexpresión, respecto a una muestra de referencia.

Preferiblemente el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de hígado, carcinoma esofágico de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo. Más preferiblemente es cáncer de mama, y aún más preferiblemente es cáncer de mama  
20 receptor de estrógenos negativo y triple negativo.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la supervivencia libre de recaída en un individuo con cáncer, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende:

a) obtener una muestra biológica aislada del individuo,

25 b) detectar el producto de expresión de ATF4

Preferiblemente se detectan los niveles de expresión, bien de la proteína, o bien del ARNm que lo codifica.

En una realización preferida de este aspecto el primer método de la invención además comprende:

c) asignar a dicho individuo al grupo de individuos con una menor supervivencia libre de recaídas cuando ATF4 presenta una expresión superior, o sobreexpresión, respecto a una muestra de referencia.

5 Preferiblemente el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de hígado, carcinoma esofágico de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo. Más preferiblemente es cáncer de mama, y aún más preferiblemente es cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo.

10 Otro **aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la supervivencia libre de recaída en un individuo con cáncer, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende:

a) obtener una muestra biológica aislada del individuo,

15 b) detectar el producto de expresión de *ATF4*, *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1*, *EIF4EBP1* o cualquiera de sus combinaciones; preferentemente de ATF4 y al menos uno de los genes *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1* y *EIF4EBP1*, y más preferentemente el de todos ellos.

Preferiblemente se detectan los niveles de expresión, bien de la proteína, o bien del ARNm que lo codifica.

20 En una realización preferida de este aspecto el primer método de la invención además comprende:

25 c) asignar a dicho individuo al grupo de individuos con una menor supervivencia libre de recaídas cuando *ATF4*, *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1*, *EIF4EBP1* o cualquiera de sus combinaciones; preferentemente de ATF4 y al menos uno de los genes *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1* y *EIF4EBP1*, y más preferentemente el de todos ellos; presentan una expresión superior, o sobreexpresión, respecto a una muestra de referencia.

30 Preferiblemente el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de hígado, carcinoma esofágico de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo. Más preferiblemente es cáncer de mama, y aún más preferiblemente es cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo.

En el contexto de la presente invención, se entiende "muestra de referencia" o "valor de referencia" como la muestra que se usa para determinar la variación de los niveles de expresión de las proteínas o ácidos nucleicos de la presente invención. En una realización de la invención,

el valor de referencia se obtiene a partir de la señal proporcionada usando una muestra de tejido obtenida de un individuo que no presenta un tumor. Preferiblemente, las muestras se toman de varios individuos con y sin cáncer y se combinan, de tal manera que el valor de referencia refleja el valor promedio de dichas moléculas en la población de individuos con y sin cáncer. "Valor de referencia" es el nivel de una proteína de la invención o de los ácidos nucleicos de la presente invención en la muestra de referencia.

Los niveles de expresión de los genes van a dar un determinado perfil de expresión génica. El término "nivel", "nivel de expresión", también denominado "cantidad producto génico" se refiere al material bioquímico, ya sea ARN o proteína, resultado de la expresión de un gen. Algunas veces se usa una medida de la cantidad de producto génico para inferir qué tan activo es un gen. Se entiende por "perfil de expresión génica" el perfil génico obtenido tras la cuantificación del ARNm y/o de proteína producida por los genes de interés o biomarcadores, es decir, por los genes empleados como marcadores biológicos en la presente invención, en una muestra biológica aislada. El perfil de expresión de los genes se realiza, preferiblemente, determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, previa extracción del ARN total presente en la muestra biológica aislada, lo cual puede realizarse mediante protocolos conocidos en el estado de la técnica. La determinación del nivel de ARNm derivado de la transcripción de los genes empleados como marcadores biológicos en la presente invención, puede realizarse, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), RT-PCR cuantitativa, retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; análisis en serie de la expresión génica (SAGE, SuperSAGE); chips de ADN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; microarrays de ADN elaborados con oligonucleótidos sintetizados in situ mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación in situ utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio. El perfil de expresión génica también podría obtenerse mediante la detección y/o cuantificación de las proteínas producto de la traducción del ARNm derivado de la transcripción de los genes empleados como marcadores biológicos en la presente invención, mediante por ejemplo, pero sin limitarnos, inmunodetección por western blot. La detección cuantitativa de la expresión de los genes empleados como marcadores biológicos en la presente invención puede realizarse más preferiblemente mediante PCR en tiempo real (RT-PCR o RTqPCR). La detección en tiempo real de los productos

amplificados puede llevarse a cabo mediante la utilización de moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN de cadena doble o mediante hibridación con diferentes tipos de sondas.

Así pues, la detección de los niveles de proteínas o del nivel de expresión de los genes puede hacerse por cualquiera de las técnicas conocidas por el experto en la materia.

- 5 Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada son células tumorales, tejido tumoral y/o biopsia líquida (sangre, suero, plasma, orina,...).

10 El término “individuo”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término “individuo” en esta memoria, es sinónimo de “paciente”, y no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

15 El término “fármaco”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención, la enfermedad es cáncer, preferiblemente cáncer de mama.

Los pasos (b) y/o (c), del método descrito anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la presencia en el paso (b) o la clasificación computarizada en el paso (c).

- 20 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la detección del paso (b) se realiza mediante PCR, preferiblemente RT-PCT.

25 En el caso de que se detecte el nivel o los niveles de proteínas puede hacerse, al igual que en el caso de los genes, por cualquiera de las técnicas conocidas por el experto en la materia. Así, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, la detección de los niveles de expresión se realiza por una técnica inmunológica. En una realización más preferida, las técnicas inmunológicas están basadas en reacciones de precipitación, basadas en reacciones de aglutinación, inmunomarcación, radioinmunoanálisis y técnicas radioinmunométricas, ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay), o en cualquiera de sus combinaciones.

30 Otro **aspecto** de la invención se refiere a método para predecir o pronosticar la supervivencia global en un individuo con cáncer y/o para predecir o pronosticar la supervivencia libre de recaída en un individuo con cáncer, que comprende los pasos (a) - (c) según cualquiera de los métodos de la invención, y además comprende:

d) asignar al individuo que presenta una expresión de ATF4 igual o mayor a aproximadamente el cuartil alto de expresión al grupo de individuos con una menor supervivencia global, y/o

d1) asignar al individuo que presenta una expresión de ATF4 igual o mayor a aproximadamente el tercil alto de expresión al grupo de individuos con una menor supervivencia libre de recaídas,  
5 y/o

d2) asignar al individuo con cáncer de mama positivo para receptor de estrógeno (ER+) que presenta una expresión de ATF4 igual o mayor a aproximadamente el tercil alto de expresión al grupo de individuos con una menor supervivencia libre de recaídas, y/o

d3) asignar al individuo cáncer de mama negativo para receptor de estrógenos (ER-) que  
10 presenta una expresión de ATF4 igual o mayor a aproximadamente el cuartil alto de expresión al grupo de individuos con una menor supervivencia libre de recaídas, y/o

d4) asignar al individuo cáncer de mama negativo para receptor de estrógenos (ER-) que presenta una expresión de ATF4 igual o mayor a aproximadamente el cuartil alto de expresión al grupo de individuos con una menor supervivencia libre de recaídas

#### 15 *KIT DE LA INVENCION Y USOS*

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante primer kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para detectar el producto de expresión de *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1*, *EIF4EBP1*, *ATF4* o cualquiera de sus combinaciones, preferentemente para detectar el producto de expresión de  
20 *ATF4* y al menos uno de los genes *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1* y *EIF4EBP1*, preferentemente para detectar el producto de expresión de todos ellos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el primer kit o dispositivo de la invención es adecuado para amplificar secuencias nucleotídicas, que comprenden sondas y/o cebadores diseñados a partir de las secuencias SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ  
25 ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 13y/o SEQ ID NO:15, así como opcionalmente todos aquellos elementos necesarios para llevar a cabo un procedimiento PCR.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit puede contener oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm del gen, y/o capaces de hibridar con la secuencia de *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1*,  
30 *EIF4EBP1*, *ATF4* o cualquiera de sus combinaciones, preferentemente de *ATF4* y al menos un gen seleccionado de entre *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1* y *EIF4EBP1*, más preferentemente con la de todos ellos; para posterior amplificación por PCR. Más preferiblemente las secuencias de los genes son las referidas en las secuencias anteriores.

Preferiblemente, los oligonucleótidos presentan modificaciones en alguno de sus nucleótidos, como por ejemplo, pero sin limitarnos a, nucleótidos que tengan alguno de sus átomos con un isótopo radiactivo, normalmente  $^{32}\text{P}$  o tritio, nucleótidos marcados inmunológicamente, como por ejemplo con una molécula de digoxigenina, y/o inmovilizadas en una membrana. Varias posibilidades son conocidas en el estado de la técnica.

Así pues, el primer kit o dispositivo de la invención comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de detectar el producto de expresión de *ATF4*, *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1*, *EIF4EBP1* o cualquiera de sus combinaciones; preferentemente de *ATF4* y al menos uno de los genes *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1* y *EIF4EBP1*, y más preferentemente el de todos ellos; y donde:

- los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 y/o SEQ ID NO:15;

- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 80 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 200 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 y/o SEQ ID NO:15;

- los anticuerpos son capaces de unirse específicamente a una región formada por cualquiera de las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14 y/o SEQ ID NO: 16.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos frente a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO: 14 y/o SEQ ID NO:16, o frente a secuencias aminoacídicas que presenten un grado de identidad con dichas secuencias aminoacídicas de, al menos del 85%, típicamente de, al menos del 90%, preferiblemente de, al menos del 95%, más preferiblemente de, al menos del 98%, aún más preferiblemente de, al menos del 99%. En otra realización preferida de este

aspecto de la invención, el anticuerpo es humano, humanizado o sintético. En otra realización preferida, el anticuerpo es monoclonal y/o se encuentra marcado con un fluorocromo. Preferiblemente, el fluorocromo se selecciona de la lista que comprende Fluoresceína (FITC), Tetrametilrodamina y derivados, Ficoeritrina (PE), PerCP, Cy5, Texas, alofococianina, o cualquiera de sus combinaciones.

El kit de la invención puede incluir controles positivos y/o negativos. El kit además puede contener, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

Es también posible que el(los) oligonucleótido(s) estén inmovilizados en manchas sobre una superficie (preferiblemente sólida). En una de sus realizaciones, el kit comprende una micromatriz, o micromatriz de la invención. Una micromatriz de ARN es una matriz sobre un sustrato sólido (normalmente un porta de vidrio o una celda de una película fina de silicio) que evalúa grandes cantidades de diferentes ARN que son detectables mediante sondas específicas inmovilizadas sobre manchas sobre un sustrato sólido. Cada mancha contiene una secuencia específica de ácido nucleico, normalmente una secuencia de ADN, como sondas (o indicadores). Aunque el número de manchas no está limitado de manera alguna, existe una realización preferida en la que la micromatriz se personaliza para los procedimientos de la invención. En una realización, dicha matriz personalizada comprende cincuenta manchas o menos, tal como treinta manchas o menos, incluyendo veinte manchas o menos. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una micromatriz que comprende oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm de los genes, y/o capaces de hibridar con la secuencias de los genes *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1*, *EIF4EBP1*, *ATF4* o cualquiera de sus combinaciones, preferentemente de *ATF4* y al menos un gen seleccionado de entre *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1* y *EIF4EBP1*, más preferentemente con todos ellos.

Más preferiblemente, las secuencias de *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1*, *EIF4EBP1*, *ATF4* son las secuencias nucleotídicas indicadas anteriormente.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del primer kit o dispositivo de la invención, para la obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la supervivencia global y/o la supervivencia libre de recaída en un individuo con cáncer. Preferiblemente el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de hígado, carcinoma esofágico de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de mama receptor

de estrógenos negativo y triple negativo. Más preferiblemente es cáncer de mama, y aún más preferiblemente es cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador que comprende instrucciones de programa para hacer que un ordenador lleve a la práctica el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.

En particular, la invención abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una portadora. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Cuando el programa va incorporado en una señal que puede ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, la portadora puede estar constituida por dicho cable u otro dispositivo o medio. Como variante, la portadora podría ser un circuito integrado en el que va incluido el programa, estando el circuito integrado adaptado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de, los procesos correspondientes.

Por ejemplo, los programas podrían estar incorporados en un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor, una memoria USB, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un disco duro. Alternativamente, los programas podrían estar soportados en una señal portadora transmisible. Por ejemplo, podría tratarse de una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios.

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Tales programas pueden tener la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención. Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

Por tanto, otro **aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender las cinco bases que aparecen biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco que aparecen biológicamente. Estas bases pueden servir para distintos propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para estimular o inhibir la degradación

de la sonda; o como puntos de unión para restos detectables o restos de apantallamiento. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de base modificados, no estándar, derivatizados, incluyendo, pero sin limitarse a, N<sup>6</sup>-metil-adenina, N<sup>6</sup>-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N<sup>6</sup>-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N<sup>6</sup>-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N<sup>6</sup>-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo (es decir, timina), éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)<sub>w</sub>, 2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de restos de bases modificados, no estándar, o derivatizados pueden encontrarse en las Patentes de EEUU Nos. 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Además, una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados incluyendo, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxirribonucleótidos (ADN o DNA).

Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

En la presente invención se entiende por variante o fragmento biológicamente activo, aquellas variantes o fragmentos de los péptidos indicados que tienen un efecto fisiológico, metabólico o inmunológico igual, o presentan la misma utilidad que los descritos. Esto es, son funcionalmente equivalentes. Dichos efectos se pueden determinar mediante métodos convencionales.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, Nucleic Acids Research 12: 287 (1984) Genetics Computer Group University of Wisconsin,

Madison, (WI); BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, 1999. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

Adicionalmente, los autores de la presente invención han demostrado, como se pone de manifiesto en los ejemplos de la invención, que la inhibición de ATF4 redujo la migración y la invasión, la eficiencia de formación de mamoesferas, la proliferación, la transición epitelio-mesenquimal, la verosimilitud del cáncer y los marcadores antiapoptóticos. En los modelos de ratón PDX, el silenciamiento de ATF4 disminuyó la metástasis, el crecimiento tumoral y la recaída después de la quimioterapia. Además, las investigaciones mostraron que ATF4 está abajo de TGFβ/SMAD2/3/4, TGFβ/PI3K/mTORC2 y regula mTOR / Rac1-RhoA independientemente en el estrés. Demuestran que la expresión de ATF4 podría modular la agresividad de TNBC, e influir aún más en el resultado del paciente. Además, ATF4 regula la metástasis a través de EMT, RhoA y Rac1, CSC y pluripotencialidad, proliferación y resistencia a los fármacos, vías que desarrollan la agresividad de TNBC. ATF4 opera en el estrés celular, integrando y modulando las rutas TGFβ / Smad4 y TGFβ / PI3K / mTORC1 / 2 en su lugar.

#### 15 *USOS MÉDICOS DE LA INVENCION*

Por tanto, otro **aspecto** de la invención se refiere a una composición que comprende un agente modulador de la actividad de ATF4 para su uso en el tratamiento del cáncer.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer se selecciona de la lista que consiste en cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de hígado, carcinoma esofágico de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo. Más preferiblemente el cáncer es cáncer de mama, y aún más preferiblemente cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo.

El término "ATF4" (también llamado en la literatura CREB2; TXREB; CREB-2; TAXREB67) se refiere a un el gen codifica un factor de transcripción que se identificó originalmente como una proteína de unión a ADN de mamífero ampliamente expresada que podría unirse a un elemento potenciador de respuesta tributaria en el LTR de HTLV-1. La proteína codificada también se aisló y caracterizó como la proteína 2 de unión al elemento de respuesta de cAMP (CREB-2). La proteína codificada por este gen pertenece a una familia de proteínas de unión al ADN que incluye la familia de factores de transcripción AP-1, proteínas de unión al elemento de respuesta de cAMP (CREB) y proteínas de tipo CREB. Estos factores de transcripción comparten una región de cremallera de leucina que está involucrada en las interacciones proteína-proteína, localizada en C-terminal a un tramo de aminoácidos básicos que funciona como un dominio de unión de ADN. Se han descrito dos transcripciones alternativas que codifican la misma proteína. Dos pseudogenes están ubicados en el cromosoma X a q28 en una región que contiene una gran duplicación invertida.

A no ser que se indique lo contrario, cuando se utiliza en el presente documento el término "ATF4", se refiere tanto al gen como a la proteína ATF4 humana. En el contexto de la presente invención, ATF4 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína ATF4, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético, d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2. en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ATF4. Entre otras posibles secuencias nucleotídicas que codifican *ATF4* se encuentra, pero sin limitarse, la SEQ ID NO: 1

El término "que modula la actividad" como se usa aquí, se refiere tanto a que inhibe (disminuye) o estimula (incrementa) el nivel de actividad de la proteína ATF4 en una célula. La actividad de ATF4 puede ser modulada por la modificación de los niveles y/o de la actividad de la proteína ATF4, o por la modificación de los niveles a los que se transcribe el gen ATF4 tal que los niveles de actividad de la proteína ATF4 en la célula es modulada. Los agentes moduladores pueden ser también agonistas (sustancias que son capaces de unirse a un receptor y provocar una respuesta en la célula, en concreto un aumento de la actividad de ATF4), como antagonistas (sustancias que no solamente no activan el receptor, sino que en realidad bloquea su activación por los agonistas). En el contexto de la presente invención, la inhibición es la forma preferida de modulación.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, los agentes moduladores comprendidos en la composición de la invención se seleccionan de una lista que comprende: a) una molécula orgánica, b) una molécula de ARN, c) un oligonucleótido antisentido, d) un anticuerpo, o e) una ribozima.

Un experto en la materia podría preparar moléculas orgánicas que pueden unirse específicamente a la ATF4 sin unirse a otros polipéptidos o proteínas. Las moléculas orgánicas tendrán preferiblemente un peso de 100 a 20.000 daltons, más preferiblemente 500 a 15.000 daltons, y más preferiblemente 1000 a 10.000 daltons. Librerías de moléculas orgánicas se encuentran disponibles comercialmente. La vía de administración puede ser, sin limitarse a estas, intraperitoneal, intratecal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraventricular, oral,

enteral, parenteral, intranasal o dérmica. Entre las moléculas orgánicas moduladoras de la actividad de ATF4 se encuentran, pero sin limitarnos, inhibidores de TGFBR1 (ej. Galunisertib o LY2157299), inhibidores de PI3K (ej. LY294002, BKM120), inhibidores de mTOR (ej. rapamicina), inhibidores duales de PI3K/mTORC1/mTORC2 (ej. Omipalisib o GSK2126458),  
5 inhibidores de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (ej. ISRIB) o compuestos como el antihelmíntico pirvinio pamoato.

Recientemente, con el desarrollo de la tecnología antisentido, secuencias de nucleótidos específicamente complementarios a una determinada secuencia de ADN o ARN, podrían formar complejos y bloquear la transcripción o traducción. Así, con el progreso del silenciamiento génico  
10 post-transcripcional, y en particular del ARN de interferencia (RNA interferente o RNAi), se han desarrollado herramientas que permiten la inhibición específica de la expresión de un gen. La inhibición de la expresión de la proteína ATF4 constituiría por ende la inhibición de su actividad biológica, y en concreto, de la actividad que está contribuyendo al agravamiento de las características tumorales.

15 Por "polinucleótidos antisentido" se entienden cadenas de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos que pueden inhibir la producción de la proteína ATF4 por uno de estos tres mecanismos:

1- Interfiriendo la transcripción, al hibridar en el gen estructural o en una región regulatoria del gen que codifica para ATF4. Puesto que la transcripción o expresión es bloqueada de manera  
20 efectiva por la hibridación del oligonucleótido antisentido con el ADN, disminuye la producción de ATF4.

2- La unión del oligonucleótido antisentido en el citoplasma con el ARNm, interfiriendo con la formación de la construcción de traducción propiamente dicha, inhibiendo la traducción de ARNm a la proteína.

25 3- La formación de un ARNm - antisentido dúplex que permite una rápida degradación del ARNm dúplex por ARNasas (como ARNasa H). Esto da lugar a una menor producción de ATF4.

Oligonucleótidos antisentido capaces de modular la actividad de la ATF4 son conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, y sin limitarnos, podría ser una secuencia de ribonucleótidos o ARN que pertenece al denominado siRNA (small interfering RNA), ARN pequeño de  
30 interferencia o ARN de silenciamiento, capaz de inhibir la expresión genética de la proteína ATF4. En el contexto de la presente memoria se entiende como "siRNA" (small interfering RNA ó ARN pequeño de interferencia) una clase de ARN de doble cadena de 19 a 25 nucleótidos de largo, y más preferentemente entre 21 y 23 nucleótidos, que está involucrado en la ruta de la interferencia de ARN, donde el siRNA interfiere la expresión de un gen específico. En la presente invención,  
35 este gen específico es el ATF4. También podría ser cualquier siRNA capaz de hibridar una

molécula de ácido nucleico que codifique la proteína ATF4 humana que se recoge en la SEQ ID NO: 2. También podrían ser una construcción de ARN que al menos contenga una cualquiera de las secuencias de nucleótidos posibles de siRNA capaces de inhibir la expresión de ATF4, y sin perjuicio de que adicionalmente formen parte de la presente invención cualquiera de las 5 secuencias y construcciones de RNA de la invención anteriormente descritas que sean objeto de modificaciones, preferentemente químicas, que conduzcan a una mayor estabilidad frente a la acción de ribonucleasas y con ello a una mayor eficiencia. Sin que dichas modificaciones supongan la alteración de su mecanismo de acción, que es la unión específica al complejo RISC (RNA-induced silencing complex), activándolo y manifestando una actividad helicasa que separa 10 las dos hebras dejando solo la hebra antisentido asociada al complejo. El complejo ribonucleoprotéico resultante se une al mRNA diana (ARN mensajero del ATF4, que se recoge en la SEQ ID NO: 1). Si la complementariedad no es perfecta, RISC queda asociado al mensajero y se atenúa la traducción. Pero si es perfecta, RISC actúa como RNasa, cortando al mensajero y quedando libre para repetir el proceso.

15 Adicionalmente resulta evidente para un experto en la materia que una gran cantidad de polinucleótidos de mRNA pueden traducirse a ATF4 como consecuencia, por ejemplo, de que el código genético es degenerado. Cualquier siRNA capaz de inhibir la traducción de estos mRNA también forma parte de la invención.

La preparación de la secuencia de siRNA de la invención o de la construcción de RNA de la 20 invención sería evidente para un experto en la materia, y se podría llevar a cabo por síntesis química, lo cual permite además la incorporación de modificaciones químicas tanto en los distintos nucleótidos del producto como la incorporación de otros compuestos químicos en cualquiera de los extremos. Por otro lado, la síntesis también podría realizarse enzimáticamente utilizando cualquiera de las RNA polimerasas disponibles. La síntesis enzimática también permite 25 alguna modificación química de los productos o RNAs inhibidores.

El diseño de la secuencia de nucleótidos del siRNA de la invención también sería evidente para un experto en la materia. Así, se podría realizar mediante un diseño aleatorio en el que se seleccionen 19-25 bases del ARNm diana sin tener en cuenta la secuencia o la información posicional que tiene en el transcrito. Otra alternativa no limitativa de la presente invención sería 30 el diseño convencional mediante parámetros simples desarrollados por los pioneros de la técnica (Calipel, A. et al., 2003. J Biol Chem. 278(43): 42409-42418) completados con un análisis BLAST de nucleótidos. Otra posibilidad podría ser un diseño racional, en el que se emplee un procedimiento informático dirigido a identificar las dianas óptimas de siRNA en un ARNm. Las secuencias diana se analizan en grupos de 19 nucleótidos a la vez y se identifican las que tienen 35 mejores características en función de un algoritmo que incorpora un gran número de parámetros termodinámicos y de secuencia.

También podría formar parte de la composición de la invención una construcción genética de ADN, la cual dirigiría la transcripción in vitro o intracelular de la secuencia siRNA o construcción de ARN de la invención, y que comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias:

5 a) secuencia de nucleótidos de ADN, preferentemente de doble cadena, que comprende, al menos, la secuencia codificante del siRNA de la invención o de la construcción de ARN de la invención para su transcripción, o, b) secuencia de nucleótidos de ADN, preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante de la secuencia de ARN de la invención operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y  
10 con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc. para su uso en aquellos contextos patológicos en los que ATF4 está contribuyendo al agravamiento de las características tumorales de las células cancerosas  
15 y/o a la aparición de cáncer. Múltiples de estas construcciones, sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook et al. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

Las composiciones de la presente invención permiten la transfección del siRNA de la invención  
20 al interior de una célula, in vivo o in vitro. La transfección se podría llevar a cabo, pero sin limitarnos a, transfección directa o vectores que faciliten el acceso del siRNA al interior de la célula. Así, ejemplos de estos vectores son, sin limitarse a, retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus del Herpes simplex, plásmidos de DNA no virales, liposomas catiónicos y conjugados moleculares. Así, por ejemplo, los siRNA de la presente invención, así como ARN  
25 o ADN precursores de estos siRNA, pueden conjugarse con péptidos de liberación u otros compuestos para favorecer el transporte de estos siRNA al interior de la célula.

El término "anticuerpo" tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente  
30 (inmunorreacciona con) la proteína ATF4. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub> que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina. Puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal.

Los anticuerpos capaces de unirse a la proteína ATF4 pueden ser empleados para inhibir la  
35 actividad de dicha proteína. Tales anticuerpos están disponibles comercialmente (como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, los anticuerpos.

Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, podrían ser capaces de inhibir la actividad de la proteína ATF4 que contribuye a la adquisición de las características propias cáncer. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de la ATF4 y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores.

Un "anticuerpo o polipéptido recombinante" (rAc) es uno que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del polipéptido, o produce el polipéptido como resultado de la recombinación homóloga.

Estos rAc se pueden expresar y dirigir hacia subcompartimentos celulares específicos cuando se les incorpora las secuencias apropiadas para el tráfico intracelular. Estos anticuerpos se denominan intrabodies, y han demostrado su eficacia no sólo para desviar proteínas de su compartimento habitual o bloquear interacciones entre proteínas implicadas en vías de señalización, sino también para activar proteínas intracelulares.

También forman parte de la invención las construcciones genéticas de DNA capaces de transcribirse a un péptido, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, para su uso en el tratamiento de enfermedades que cursan con cáncer. Dicha construcción genética de DNA dirigiría la transcripción in vitro o intracelular de la secuencia del anticuerpo o fragmento del mismo, y comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias: a) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, que comprende, al menos, la secuencia codificante del anticuerpo de la invención o del fragmento de anticuerpo de la invención para su transcripción in vitro, o intracelular, b) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante de la secuencia de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc. para su uso en aquellos contextos patológicos que transcurren con cáncer.

Un "ribozima" tal y como se entiende en la presente invención, se refiere a un polinucleótido catalítico (típicamente RNA), que puede construirse para reconocer específicamente, por

hibridación, un mRNA y fragmentarlo o eliminar su expresión. Las ribozimas pueden introducirse en la célula como moléculas de RNA catalíticas o como construcciones genéticas que se expresan a moléculas catalíticas de RNA.

5 En otra realización preferida de este aspecto, la composición de la invención se usa para el tratamiento de un cáncer que se selecciona de la lista que comprende: cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de hígado, carcinoma esofágico de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo.

Preferiblemente, el cáncer es el cáncer de mama, y aún más preferiblemente, el cáncer es el cáncer de mama triple negativo.

10 En esta memoria se entiende por cáncer de mama triple negativo a la forma de cáncer de mama que se caracteriza por la ausencia de expresión de receptores de estrógenos, progesterona y HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), su elevada heterogeneidad y agresividad relacionada con la aparición de recaídas y metástasis en los tres primeros años tras el tratamiento inicial, resistencia a las terapias convencionales y ausencia de otras terapias  
15 aprobadas en la actualidad para su tratamiento.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención comprende un oligonucleótido antisentido y se usa para el tratamiento del cáncer. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención comprende un oligonucleótido antisentido y se usa para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo.

20 Otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención comprende un anticuerpo y se usa para el tratamiento del cáncer. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención comprende un anticuerpo y se usa para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo.

En esta memoria "tratamiento" se refiere a tanto el tratamiento terapéutico como el profiláctico o  
25 medidas preventivas. Es decir, tratamiento se refiere también a prevenir, mejorar o tratar las alteraciones referidas, preferiblemente el cáncer, más preferiblemente el cáncer de mama, y aún más preferiblemente, el cáncer de mama triple negativo. Aquellas necesarias de tratamiento incluyen las ya asociadas con alteraciones así como en aquellas en las que se previene la alteración. Una "alteración" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con la  
30 composición de la invención, tal y como se describe en el presente documento.

La composición proporcionada por esta invención puede ser facilitada por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. Los agentes moduladores de la actividad de ATF4 de dichas composiciones se encuentran en una cantidad terapéuticamente efectiva. En el sentido utilizado

en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de agentes moduladores (o construcciones genéticas que permitan su expresión intracelular) calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos agentes (y construcciones) y el efecto terapéutico a conseguir. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

#### *MÉTODOS DE SCREENING DE FÁRMACOS DE LA INVENCIÓN*

La invención proporciona métodos para identificar compuestos que pueden ser usados para el tratamiento de enfermedades relacionadas con ATF4, y en concreto aquellas que cursan con cáncer. Estos métodos permiten la identificación de candidatos, compuestos a ensayar o agentes (por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos, moléculas orgánicas, oligonucleótidos antisentido u otras moléculas) que pueden unirse a ATF4 y/o tener un efecto activador o inhibidor de la actividad biológica de ATF4 o de su expresión, y así determinar si esos compuestos tendrían un efecto sobre las enfermedades en las que ATF4 está implicado, y en concreto aquellas que cursan con cáncer.

Los ensayos para identificar estas moléculas, compuestos o agentes que modulan la actividad de ATF4 pueden emplear células que expresan ATF4, o en ensayos con ATF4 aislado (o con sus variantes, como fragmentos biológicamente activos o proteínas de fusión que incluyen una porción o parte de ATF4).

Así, otro **aspecto** de la invención consiste en un método de selección de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento del cáncer que comprende:

- a) poner en contacto el compuesto a analizar con el polipéptido ATF4,
- b) detectar la unión de dicho compuesto a analizar con el polipéptido ATF4.

Los compuestos que se unen al polipéptido ATF4 se identificarían como agentes terapéuticos potenciales frente al cáncer.

En una realización preferida el cáncer es cáncer de mama, y aún más preferiblemente, cáncer de mama triple negativo.

Como se ha dicho, estos ensayos pueden implicar el polipéptido completo ATF4, un fragmento biológicamente activo del mismo, o una proteína de fusión que implique toda o una porción del polipéptido ATF4. Determinar la capacidad de un compuesto para modular la actividad de ATF4 puede realizarse, por ejemplo, determinando la capacidad de ATF4 de unirse o interactuar con una molécula diana de dicho compuesto, de manera directa o indirecta. Pueden ser también ensayos de actividad, midiendo de manera directa o indirecta la actividad de ATF4. También

puede ser un ensayo de expresión, determinando de manera directa o indirecta la expresión del mRNA de ATF4 o de la proteína ATF4. Estos ensayos también pueden combinarse con un ensayo *in vivo* midiendo el efecto de un compuesto test sobre los síntomas de enfermedades relacionadas con ATF4, y en concreto el cáncer (por ejemplo, pero sin limitarse, sobre modelos animales u otros sistemas modelo conocidos en la técnica).

Los compuestos a testar empleados en el método de selección de agentes terapéuticos no se limitan a moléculas orgánicas de bajo peso molecular, proteínas (incluyendo anticuerpos), péptidos, oligonucleótidos, etc. Pueden ser naturales y/o sintéticos.

Por ejemplo, anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de ATF4, que pueden ser empleados terapéuticamente, como se ha expuesto anteriormente, pueden emplearse también en ensayos inmunohistoquímicos, como Western blots, ELISAs, radioinmunoensayos, ensayos de inmunoprecipitación, u otros ensayos inmunohistoquímicos conocidos en el estado de la técnica. ATF4 puede emplearse para inmunizar a un animal, para obtener anticuerpos policlonales. También se pueden preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas que permiten la producción de anticuerpos por líneas celulares en cultivo, entre las que se incluyen, pero sin limitarse, hibridomas, hibridomas de células B humanas. Técnicas para producir anticuerpos quiméricos, humanizados o sintéticos son conocidas.

Los agentes terapéuticos identificados por el método de selección aquí descrito pueden ser usados en un modelo animal o de otro tipo para determinar el mecanismo de acción de dicho agente. Más aún, los agentes terapéuticos seleccionados por el método aquí descrito se emplearían en el tratamiento de enfermedades que cursen con la alteración de ATF4 y, en concreto, cáncer. Preferiblemente el cáncer es cáncer de mama, y aún más preferiblemente, cáncer de mama triple negativo.

En otro **aspecto** de la invención se describe un método de selección de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento del cáncer que comprende:

a) determinar la actividad de ATF4 a una concentración establecida del compuesto a analizar o en ausencia de dicho compuesto,

b) determinar la actividad de ATF4 a una concentración del compuesto a analizar diferente de la de a).

Compuestos que den lugar a una actividad diferente de ATF4 se identificarían como agentes terapéuticos potenciales frente al cáncer.

En una realización preferida el cáncer es cáncer de mama, y aún más preferiblemente, cáncer de mama triple negativo.

Otro **aspecto** de la invención consiste en un método de selección de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento del cáncer que comprende:

a) poner en contacto el compuesto a analizar con el polinucleótido ATF4, b) detectar la unión de dicho compuesto a analizar con el polinucleótido ATF4

- 5 Los compuestos que se unen al polinucleótido ATF4 se identificarían como agentes terapéuticos potenciales frente al cáncer.

En una realización preferida el cáncer es cáncer de mama, y aún más preferiblemente, cáncer de mama triple negativo.

### *DIAGNÓSTICO*

- 10 Las enfermedades en las que la alteración de la actividad de ATF4 puede ser diagnóstica, y en concreto el cáncer, pueden ser detectadas midiendo la cantidad de ácidos nucleicos (ADN y/o ARN y/o mARN) que codifican para ATF4, o la cantidad de proteína ATF4 que se expresa, en comparación con células normales. La detección de los oligonucleótidos puede hacerse por métodos bien conocidos en el estado de la técnica (como por ejemplo, pero sin limitarse, sondas con nucleótidos marcados, hibridación ADN-ADN o ADN-ARN, amplificación por PCR empleando nucleótidos marcados, la RT-PCR). Procedimientos para detectar la expresión de la proteína ATF4 también son bien conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo anticuerpos poli o monoclonales, ELISA, radioinmunoensayo (RIA), y FACS (fluorescence activated cell sorting).

- 15 Por tanto, en otro aspecto de la invención se describe un método para la recolección de datos útiles en el diagnóstico y/o pronóstico del cáncer que comprende:

a) determinar la expresión de ATF4 en una muestra extraída de un mamífero,

b) comparar los valores de la expresión de ATF4 obtenidos en a) con los valores estándar en mamíferos sanos o enfermos.

- 25 En una realización preferida, el cáncer se selecciona de la lista que comprende cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de hígado, carcinoma esofágico de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo. Más preferiblemente el cáncer es cáncer de mama, y aún más preferiblemente, cáncer de mama triple negativo.

Por lo tanto, de forma preferida, la presente invención hace referencia a los siguientes aspectos:

- 30 1.- Una composición que comprende un agente modulador de la actividad de ATF4 para su uso en el tratamiento del cáncer.

2.- La composición según el aspecto 1, en la que el agente modulador es un inhibidor de la actividad de ATF4.

3.- La composición según cualquiera de los aspectos 1-2, en la que el agente modulador se selecciona de la lista que consiste en:

- 5           a) una molécula pequeña,  
              b) una molécula de RNA,  
              c) un oligonucleótido antisentido,  
              d) un anticuerpo, o  
              e) una ribozima,  
10           o cualquiera de sus combinaciones.

4.- La composición según cualquiera de los aspectos 1-3, en la que los agentes moduladores se seleccionan de la lista que consiste en: Galunisertib, LY294002, BKM120, rapamicina, Omipalisib, ISRIB o el antihelmíntico pirvinio pamoato.

5. La composición según cualquiera de los aspectos 1-4, donde el cáncer se selecciona de la  
15 lista que consiste en: cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de hígado, carcinoma esofágico de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo.

6.- La composición según cualquiera de los aspectos 1-5, donde el cáncer es cáncer de mama.

7.- La composición según cualquiera de los aspectos 1-6, donde el cáncer es cáncer de mama  
20 triple negativo.

8.- Un método de selección de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento del cáncer que comprende:

- a) poner en contacto el compuesto a analizar con el polipéptido ATF4,  
              b) detectar la unión de dicho compuesto a analizar con el polipéptido ATF4,

25 donde los compuestos que se unen al polipéptido ATF4 se identificarían como agentes terapéuticos potenciales frente a la enfermedad según se describe en cualquiera de los aspectos 1-7.

9.- Un método de selección de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento del cáncer que comprende:

a) determinar la actividad de ATF4 a una determinada concentración del compuesto a analizar o en ausencia de dicho compuesto,

b) determinar la actividad de ATF4 a una concentración del compuesto a analizar diferente de la de a),

5 donde los compuestos que dan lugar a una actividad diferente de ATF4 se identificarían como agentes terapéuticos potenciales frente a la enfermedad según se describe en cualquiera de los aspectos 1-7.

10.- Un método de selección de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento del cáncer que comprende:

10 a) determinar la actividad de ATF4 a una determinada concentración del compuesto a analizar,

b) determinar la actividad de ATF4 en presencia de un compuesto que se conoce que modula la actividad de ATF4,

15 donde los compuestos que dan lugar a una actividad diferente de ATF4 se identificarían como agentes terapéuticos potenciales frente a la enfermedad según se describe en cualquiera de los aspectos 1-7.

11.- Un método de selección de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento del cáncer que comprende:

a) poner en contacto el compuesto a analizar con el polinucleótido ATF4,

20 b) detectar la unión de dicho compuesto a analizar con el polinucleótido ATF4.

donde los compuestos que se unen al polinucleótido ATF4 se identificarían como agentes terapéuticos potenciales frente a la enfermedad según se describe en cualquiera de los aspectos.

12.- Un método para la recolección de datos útiles en el diagnóstico y/o pronóstico del cáncer que comprende:

25 a) determinar la expresión de ATF4 en una muestra extraída de un mamífero,

b) comparar los valores de la expresión de ATF4 obtenidos en a) con los valores estándar en mamíferos sanos o enfermos.

13.- El método según cualquiera de los aspectos 8-12, donde el cáncer es el cáncer de mama.

30 14.- El método según cualquiera de los aspectos 8-12, donde el cáncer es el cáncer de mama triple negativo.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxiribonucleótidos.

5 Los términos "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## EXPOSICIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

### Análisis bioinformático

15 El trazador de Kaplan-Meier (<http://kmplot.com/analysis/>) puede evaluar el efecto de 54.675 genes sobre la supervivencia utilizando 5.143 muestras de pacientes con cáncer de mama con un seguimiento medio de 69 meses. Los datos de expresión génica, la supervivencia libre de recaída y general (RFS y OS, respectivamente) se descargan de GEO (Gene Expression Omnibus), EGA (European Genome-phenome Archive) y TCGA (The Cancer Genome Atlas)  
20 (Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123:725–31). Las bases de datos "Esserman" (Esserman LJ, Berry DA, Cheang MCU, Yau C, Perou CM, Carey L, et al. Chemotherapy response and recurrence-free survival in neoadjuvant breast cancer depends on  
25 biomarker profiles: results from the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACRIN 6657). *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132:1049–62), "Hatzis" (Hatzis C, Pusztai L, Valero V, Booser DJ, Esserman L, Lluch A, et al. A genomic predictor of response and survival following taxane-anthracycline chemotherapy for invasive breast cancer. *JAMA.* 2011;305:1873–81) y "Minn 2" (Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, et al. Genes that mediate breast cancer  
30 metastasis to lung. *Nature.* 2005;436:518–24) se descargaron de la base de datos Oncomine Cancer Microarray (Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, Varambally R, Yu J, Briggs BB, et al. Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia.* 2007;9:166–80). El análisis de Kaplan-Meier se realizó tal como se describe en (Granados-Principal S, Liu Y, Guevara ML, Blanco E, Choi DS, Qian W, et al.  
35 Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer.

Breast Cancer Res. 2015;17:25). Los análisis de correlación, alteraciones genómicas y transcriptómicas (amplificación, delección profunda, regulación positiva del ARNm y regulación negativa del ARNm) y su impacto sobre la supervivencia del paciente se estudiaron con OncoPrint y Kaplan-Meier en una base de datos de 2509 pacientes con cáncer de mama (Pereira B, Chin S-F, Rueda OM, Vollan H-KM, Provenzano E, Bardwell HA, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. Nat Commun. 2016;7:11479) utilizando la base de datos cBioPortal (Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. Cancer Discov. 2012;2:401–4, Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal. 2013;6:p11).

### **Knockdown mediada por siRNA**

siRNA para ATF4 (50 nM), Smad2/3, Smad4, PERK, PKR, GCN2, HRI, eIF2 $\alpha$ , Raptor, Rictor, TAK1 y Ras (100 nM) se transfectaron transitoriamente con Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen). Se añadió TGF $\beta$ 1 (10 ng/ml) 48 h después de la transfección durante 24 h o 72 h, dependiendo del experimento.

### **Cultivo de células**

Las líneas celulares TNBC MDA-MB-231 y BT549 se compraron de la American Type Culture Collection, y SUM159PT de Asterand. Las líneas celulares SBE (SMAD Binding Element) reporter-HEK293 (SBE-HEK293) se obtuvieron de BPS Bioscience. Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Thermo Scientific) y 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco). Las células SBE-HEK293 se cultivaron bajo selección con 400  $\mu$ g / ml de Geneticin (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. La eficiencia de formación de mamoesferas (MSFE) se realizó como publicamos previamente (Granados-Principal S, Liu Y, Guevara ML, Blanco E, Choi DS, Qian W, et al. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res. 2015;17:25). Brevemente, las células se transfectaron con siRNA para ATF4 y TGF $\beta$ 1 se añadió durante 24 h. Seguidamente, las células se trataron con tripsina, se clocaron en placa con medio de mamoesfera y se contaron después de 72 horas con un contador de colonias GelCount.

### **RT-PCR cuantitativa**

El ARN total se extrajo utilizando el kit EZNA MicroElute Total RNA (Omega Bio-tek) y la transcripción reversa se realizó con el kit de síntesis de cDNA de qScript (Quantabio) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La RT-PCR cuantitativa se realizó utilizando iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) en un QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Thermo

Fisher Scientific). Los cebadores utilizados fueron: ATF4\_Fw: CCTTCACCTTCTTACAACCT y Rv: GTAGTCTGGCTTCCTATCTC (agelkerke A, Bussink J, Mujcic H, Wouters BG, Lehmann S, Sweep FCGJ, et al. Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response. Breast Cancer Res. 2013;15:R2),  
5 GADPH\_Fw: ATCACCATCTTCCAGGAGC y Rv: CATGGTTCACACCCATGAC. La expresión de Sox2, Oct4, Notch1, Nanog y Cxcl10 se determinó con ensayos TaqMan.

### Western blot

El análisis de Western blot se realizó como se publicó en(Granados-Principal S, Liu Y, Guevara ML, Blanco E, Choi DS, Qian W, et al. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy  
10 against triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res. 2015;17:25). Las bandas de proteínas se detectaron con la cámara digital ImageQuant LAS 4000. Los anticuerpos se enumeran en la Información Complementaria.

### Ensayo reportador del elemento de unión SMAD (SBE)

Las células SBE-HEK293 se transfectaron con SiRNA para ATF4 y se trataron con TGFβ1  
15 durante 24 h. La actividad de SBE se realizó con el sistema de ensayo de luciferasa ONE-Step (BPS Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Ensayo de proliferación celular

Las células se transfectaron y se trataron con TGFβ1 durante 24 h (las células MDA-MB-231 se  
20 trataron durante 72 h) en una placa de 96 pocillos. La proliferación celular se ensayó como se publicó (Granados-Principal S, Liu Y, Guevara ML, Blanco E, Choi DS, Qian W, et al. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res. 2015;17:25).

### Migración e Invasión.

La migración se analizó mediante el ensayo de "cicatrización de heridas" tal como se publicó  
25 previamente (Granados-Principal S, Liu Y, Guevara ML, Blanco E, Choi DS, Qian W, et al. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res. 2015;17:25) en células transfectadas con SiRNA de ATF4 y más tarde con TGFβ1 durante 24 h. La invasión celular se analizó con el kit de ensayo de invasión celular Cultrex BME (Trevigen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células  
30 transfectadas se trataron con TGFβ1 durante 24 h (las células MDA-MB-231 se trataron durante 72 h). Después, las células se sembraron en una cámara transwell recubierta con BME (1X) a una densidad de 50.000 células / ml en 50 µl de medio sin FBS y se suplementaron con TGFβ1 (10 ng / ml). En el pozo del fondo, se añadió medio de crecimiento con FBS al 10% como

quimioatrayente. Medio sin FBS también se usó como control negativo. Después de 16 h, se cuantificó el número de células invasoras usando Calceína AM a 485 nm de excitación y 520 nm de emisión en comparación con una curva estándar.

## Experimentos animales

### 5 RNA-Seq

La alineación de las lecturas secuenciadas en bruto con el genoma de referencia humano (Versión hg19 de UCSC) se realizó con el software Aligner Transcripts Alignment to Reference (STAR) (versión 2.4.2). Se ensamblaron las lecturas de RNA-Seq alineadas, se analizaron con la notación de referencia hg19 (navegador del genoma UCSC) y se cuantificaron usando la suite de gemelos versión 2.2.1 para obtener FPKM (Fragments per Kilobase per million).

### Modelos de xenoinjerto derivado del paciente (PDX)

Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por la Oficina de Revisión de Uso y Cuidado de Animales del Instituto de Investigación Metodista del Hospital. Los experimentos se llevaron a cabo en dos diferentes humanos PDBC TNBC, BCM-4664 y BCM-3887 (Zhang X, Claerhout S, Prat A, Dobrolecki LE, Petrovic I, Lai Q, et al. A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Res.* 2013;73:4885–97]). Los PDX se trasplantaron a la almohadilla adiposa mamaria aclarada de *NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ* (NSG) ratones (Jackson Laboratory) mantenidos en condiciones estándar, como publicamos (Dave B, Granados-Principal S, Zhu R, Benz S, Rabizadeh S, Soon-Shiong P, et al. Targeting RPL39 and MLF2 reduces tumor initiation and metastasis in breast cancer by inhibiting nitric oxide synthase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:8838–43). Cuando los tumores eran 150-200 mm<sup>3</sup>, los ratones se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos de tratamiento (n = 8 / grupo): 1) SiRNA no codificante o codificado (SCR), 2) SiRNA para ATF4 (SiRNA n. ° 2), 3) SCR más docetaxel (Chemo + SCR, 20 mg / kg) y 4) SiRNA n. ° 2 más docetaxel (quimioterapia + SiRNA n. ° 2, 20 mg / kg). Los siRNAs se inyectaron dos veces a la semana durante 6 semanas a una dosis de 5 µg / ratón, y docetaxel se administró una vez a la semana los días 1, 14 y 28. El volumen del tumor y los pesos corporales se registraron cada 2 días. Los tumores se calipraron y el volumen se calculó según publicamos (Choi DS, Blanco E, Kim Y-S, Rodriguez AA, Zhao H, Huang TH-M, et al. Chloroquine eliminates cancer stem cells through deregulation of Jak2 and DNMT1. *Stem Cells.* 2014;32:2309–23). Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la última inyección y los tumores se recogieron para análisis adicionales. Para la recaída tumoral, se administró docetaxel a una dosis de 33 mg / kg a ratones que portaban BCM-4664, y se registró el volumen tumoral hasta aparición de morbilidad, pérdida del 20% del peso corporal o cuando los tumores alcanzaron 2 cm<sup>3</sup> de tamaño.

## Validación de ATF4 como objetivo en un modelo PDX de TNBC metastásico

Se ha informado que el modelo de PDX BCM-3887 hace metástasis a pulmones de ratón, y también se usó para desarrollar un modelo altamente metastásico (3887-LM) mediante el trasplante en serie de un nódulo metastásico de pulmones de la siguiente manera. Se trasplantó un fragmento de tejido tumoral BCM-3887 en la almohadilla de grasa mamaria de ratones NSG. Cuando los tumores alcanzaron 200-250 mm<sup>3</sup>, se eliminaron y los ratones se mantuvieron vivos hasta que los ratones mostraron signos de morbilidad o pérdida de peso corporal. Después de la eutanasia, se extrajeron los pulmones y se reseco cualquier nódulo metastásico, se colocó en RPMI suplementado con 10% de SFB y se trasplantó en serie a la almohadilla de grasa mamaria de los nuevos ratones NSG de 4 a 5 semanas de edad. Este proceso se repitió hasta la segunda generación, llamada 3887-LM, y se usó para nuestros estudios. Brevemente, se trasplantó un fragmento de tejido en la almohadilla de grasa mamaria de ratones NSG (n = 10); cuando los tumores eran de 150-200 mm<sup>3</sup>, los eliminamos y se permitió a los ratones una recuperación de una semana desde la cirugía antes de los tratamientos. Los ratones se asignaron al azar a dos grupos de tratamiento (n = 5 / grupo): 1) SCR y 2) siRNA # 2. Cada SiRNA se administró por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 6 semanas a una dosis de 5 µg / ratón. Los ratones se sacrificaron por signos de morbilidad metastásica o pérdida de peso corporal. Los pulmones y los hígados se evaluaron macroscópicamente para metástasis y se conservaron en formalina para inmunohistoquímica adicional (IHC).

## Preparación de nanopartículas liposómicas

ARNsi para ATF4 (siATF4) y control (siSCR) para el suministro in vivo se incorporaron en liposomas DOPC como se describió previamente (34). Se mezcló siRNA con DOPC con exceso de butanol terciario (relación de 1:10, p / p) y la posterior adición de Tween 20. La mezcla se congeló en un baño de acetona / hielo seco y se liofilizó. Antes de la administración in vivo, la preparación liofilizada se hidrataba con PBS a una concentración de 25 µg / ml (cada ratón recibía 5 µg de SiRNA en 200 µl / inyección por vía intraperitoneal).

## Citometría de flujo

Los cambios en la población con Aldefluor positivo (ALDF +) (StemCell Technologies) se analizaron mediante citometría de flujo como se describió previamente (33) en células individuales aisladas del tejido tumoral PDX después del corte y la lisis de los glóbulos rojos. Las células se analizaron en un citómetro de flujo LSR Fortessa (BD Biosciences).

## Inmunohistoquímica

La evaluación de metástasis a pulmones e hígados se realizó por análisis inmunohistoquímico de Ki67 (Dako, M7240) (dilución 1: 100) como se describió previamente (Dave B, Granados-

Principal S, Zhu R, Benz S, Rabizadeh S, Soon-Shiong P, et al. Targeting RPL39 and MLF2 reduces tumor initiation and metastasis in breast cancer by inhibiting nitric oxide synthase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:8838–43).

### Análisis estadístico

5 La significación estadística entre dos grupos se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas. Se analizaron comparaciones múltiples con ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Bonferroni. El volumen del tumor se evaluó mediante ANOVA de dos vías y prueba post hoc de Bonferroni. La mediana de supervivencia post-tratamiento se analizó utilizando la prueba Log-rank (Mantel-Cox). La correlación de la expresión génica alta con la mediana de supervivencia  
10 (RFS y OS) en pacientes con cáncer de mama se analizó mediante el plotter de supervivencia Kaplan-Meier, y se calculó la relación de riesgo con intervalos de confianza del 95% y valor P de log-rank. Los pacientes se dividieron mediante el cálculo de todos los percentiles de expresión entre los cuartiles inferior y superior, y el umbral de mejor rendimiento se utilizó como punto de corte en el análisis de regresión de Cox como se describió anteriormente (Mihály Z, Kormos M,  
15 Lánckzy A, Dank M, Budczies J, Szász MA, et al. A meta-analysis of gene expression-based biomarkers predicting outcome after tamoxifen treatment in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;140:219–32). Para el análisis de genes múltiples, utilizamos el clasificador de multigene y la expresión media de los genes. La supervivencia mediana de la cohorte de expresión de genes altos se normalizó a la cohorte de expresión de genes bajos como  
20 porcentaje. Se calculó el cambio en el pliegue de supervivencia: FC (%) = Supervivencia de la cohorte "Alta expresión" - 100 (línea de base). Se realizó una corrección de prueba múltiple usando un método de incremento (<http://www.kmplot.com/multipletesting/>) como se describió anteriormente (Mihály Z, Kormos M, Lánckzy A, Dank M, Budczies J, Szász MA, et al. A meta-analysis of gene expression-based biomarkers predicting outcome after tamoxifen treatment in  
25 breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;140:219–32). El rendimiento de nuestra firma de ocho genes y para el análisis de múltiples genes se evaluó mediante el método de validación cruzada de dejar salir uno (LOOCV) como se describió anteriormente (Komisarof J, McCall M, Newman L, Bshara W, Mohler JL, Morrison C, et al. A four gene signature predictive of recurrent prostate cancer. *Oncotarget*. 2017;8:3430–40, Fjeldbo CS, Julin CH, Lando M, Forsberg MF,  
30 Aarnes E-K, Alsner J, et al. Integrative Analysis of DCE-MRI and Gene Expression Profiles in Construction of a Gene Classifier for Assessment of Hypoxia-Related Risk of Chemoradiotherapy Failure in Cervical Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22:4067–76). Los análisis de correlación se realizaron usando la correlación de Person. A P <0.05 se consideró significativo.

### RESULTADOS

35 **La expresión alta de ATF4 se correlaciona con una menor supervivencia del paciente y está abajo de Smad4.**

La importancia de ATF4 como biomarcador pronóstico en el cáncer de mama se determinó mediante el análisis de Kaplan-Meier en diferentes bases de datos. En la base de datos del trazador Kaplan-Meier (KM), la cohorte de pacientes con alta expresión de ATF4 se correlacionó con peor sistema operativo (n = 1402, P = 0.0095) y RFS (n = 3951, P = 8.4e-6) en todos los casos de cáncer de mama (Todos BC), y RFS en ER<sup>-</sup> (n = 801, P = 0.0058) y ER<sup>+</sup> (n = 2061, P = 0.0011) (Fig. 1A y Fig. 1A complementaria). ATF4 está sobreexpresado en pacientes TNBC; en las bases de datos TNBC, nuestros datos muestran que la sobreexpresión de ATF4 fue pronóstico de menos OS en "Esserman" (n = 98, P = 0,0034) (Figura 1B complementaria), RFS en KM plotter (n = 255, P = 0,016) y "Esserman" (P = 0,0038) (Fig. 1A y Fig. 1B complementaria) y supervivencia libre de metástasis en "Minn 2" (n = 81, P = 0,0056) y "Hatzis" (n = 497, P <0,0001) (Fig. 1C suplementaria).

Debido a que el microambiente de TNBC a menudo está enriquecido en ligandos de TGFβ, nos preguntamos si ATF4 está influenciado por la señalización de TGFβ en TNBC y encontramos mayor expresión de ATF4 en células BT549 y SUM159PT tratadas con TGFβ1, que fue inhibida por el inhibidor de la cinasa de TGFβR1 LY2157299, lo que sugiere que ATF4 es un objetivo corriente abajo (figura 1B).

Mediante *knockdown de genes*, confirmamos que ATF4 está regulado por Smad4 (Fig. 1C). Para determinar la importancia de ATF4 en la ruta de TGFβ, inhibimos ATF4 con SiRNA y se probó la actividad de SBE. La secuencia de SiRNA más eficaz seleccionada, SiRNA N° 2 (Fig. 2A complementaria), provocó una disminución de la actividad de SBE en células HEK-293 (Fig. 1D) y niveles de proteína de p-Smad2/3, Smad2/3 y Smad4 en células BT549 y SUM159PT (Fig. 1E), lo que sugiere una retroalimentación positiva sobre TGFβ. De hecho, la coexpresión de ATF4 y los miembros de la vía canónica TGFβ se correlacionan con una OS significativamente peor (P = 0,0038) en el *plotter* KM (Fig. 1F), con un cambio de supervivencia positiva a negativa en coexpresión con Smad4 o Smad3 en todos los BC (Fig. 1G). LOOCV demostró que ATF4 era determinante para mantener un sistema operativo significativamente menor (Tabla S1 complementaria).

### **La inhibición de ATF4 suprime la agresividad de las líneas celulares TNBC.**

Para confirmar si ATF4 podría influir en el potencial metastásico y el crecimiento celular, ATF4 se silenció en tres líneas celulares TNBC tratadas con TGFβ1. La depleción de ATF4 condujo a reducir la capacidad de curación de la herida (figura 2A y la figura 2B complementaria) y la invasión con y sin quimioatrayente (figura 2B). Estos resultados se correlacionaron con una regulación a la baja de los factores de transcripción relacionados con la transición epitelio-mesenquimal (EMT) (Zeb1, Twist1, Snail y Slug), que fue uniforme en las tres líneas celulares

solo después del tratamiento con TGF $\beta$ . N-Cadherin también se redujo en BT549 y SUM159PT, pero no se detectó en MDA-MB-231 (Fig. 2C). La proliferación celular disminuyó después de la anulación de ATF4 (Fig. 2D), seguido por una menor expresión de Bcl2 y Mcl1 en las tres líneas celulares (Fig. 1E).

#### 5 **Las propiedades de autorrenovación y pluripotencialidad de las células TNBC se suprimen después de la depleción de ATF4.**

Las células pluripotentes tumorales (CSC) contribuyen a la metástasis, el crecimiento tumoral y la resistencia al tratamiento. Para determinar si la función de ATF4 en la agresividad de TNBC podría verse influenciada por un efecto sobre CSC, primero evaluamos la expresión de ATF4 en mamíferas (MS) como marcador sustituto de CSC frente a células unidas. Los niveles de proteína se incrementaron en términos de tiempo y generación de MS (figura 3A y figura 2C complementaria). En consecuencia, investigamos si la depleción de ATF4 podría conducir a una disminución de MSFE. Nuestros resultados muestran reducción de MSFE en todas las líneas celulares después de la depleción de ATF4 (Fig. 3B). ATF4 está regulado positivamente por estrés oxidativo en cultivos en suspensión (12). Para evaluar si nuestros resultados en MS y MSFE se debieron a una modulación de las propiedades de pluripotencialidad o una consecuencia de la separación, se midieron los niveles de ARNm de los *stemness* marcadores después de la inhibición de ATF4. Encontramos la subexpresión de Nanog, Sox2, Oct4 y Cxcl10 en células BT549 y SUM159PT (Fig. 3C). Estos resultados se confirmaron a niveles de proteína, aunque no se detectó Cxcl10 (Fig. 3D). De forma importante, se suprimieron Notch1 y Oct4 escindidos consistentemente en las tres líneas celulares probadas, y se acompañaron de una clara inhibición de CD44 (Fig. 3D).

#### **ATF4 reduce la metástasis, el crecimiento tumoral y la recaída en modelos de ratón PDX.**

Para los estudios *in vivo*, se seleccionaron los BCM-3887 metastásicos y los modelos altamente agresivos BCM-4664 PDX con expresión de ARNm ATF4 alta y media por ARN-Seq, respectivamente (figura 4A).

Para demostrar si el silenciamiento de ATF4 podría inhibir la metástasis del tumor de mama, utilizamos un modelo de PDX altamente metastásico (3887-LM) en ratones. Después de la eliminación del tumor primario, los ratones se trataron con SiRNA # 2 ATF4 conjugado con DOPC y control negativo (SCR) dos veces a la semana durante 6 semanas. Los animales tratados con SiRNA n. ° 2 exhibieron nódulos metastásicos menos evidentes en hígado (figura 4B) y pulmones (figura 4C). Las lesiones metastásicas se confirmaron microscópicamente por IHC de Ki67 (Fig. 4D).

Para abordar si ATF4 podría representar un objetivo terapéutico atractivo en TNBC, evaluamos el crecimiento tumoral, la población CSC y la recaída tumoral después del tratamiento con ATF4

siRNA y / o docetaxel. El direccionamiento in vivo de ATF4 redujo significativamente el crecimiento tumoral solo ( $P < 0,01$ ) o en combinación con docetaxel ( $P < 0,05$ ) (figura 5A) y la población de ALDF + en BCM-3887 (figura 5B). En el modelo BCM-4664, la inhibición de ATF4 restringió significativamente el crecimiento tumoral ( $P < 0,001$ ) (figura 5C) y la población de ALDF + (figura 5D). Para investigar la recidiva tumoral después de la quimioterapia, se coadministraron ATF4 siARN y docetaxel (33 mg / kg) dos veces a la semana durante 6 semanas a los ratones con tumores BCM-4664. Los tumores Chemo+SCR alcanzaron el volumen mínimo (124 mm<sup>3</sup>) el día 24 y comenzaron a volver a crecer el día 28 (128 mm<sup>3</sup>), mostrando un aumento de 2.4 veces el día 38. Por el contrario, el volumen tumoral en Chemo + siRNA # 2 fue de 63 mm<sup>3</sup> en el día 24, y comenzaron a volver a crecer en el día 28 (78 mm<sup>3</sup>), mostrando un aumento de 1,4 veces en el día 38. En el día 56, el volumen del tumor en Chemo + SCR fue 2083 mm<sup>3</sup> y 548 mm<sup>3</sup> en quimio + siRNA n. ° 2 ( $p < 0,001$ ) (figura 5C). La mediana del postratamiento de supervivencia fue de 28 días en Chemo + siRNA # 2 y 19 días en Chemo + SCR ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 5E). Para confirmar que ATF4 fue dirigido de manera eficiente, se midió su expresión por Western blot en BCM-3887 (Fig. 5F) y tumores BCM-4664 (Fig. 5G).

#### **ATF4 está aguas abajo de mTORC2 y regula mTOR/Rac1-RhoA independientemente del estrés.**

Tras el estrés celular, ATF4 se activa mediante la fosforilación de eIF2 $\alpha$  como el núcleo central de ISR. Para probar si TGF $\beta$  estimula ATF4 dependiendo del ISR, inhibimos PERK, PKR, GCN2, hRI y eIF2 $\alpha$ , en tres líneas celulares TNBC en presencia de TGF $\beta$ 1. Colectivamente, su inhibición no regula negativamente ATF4 de forma consistente a través de las líneas celulares (Fig. 6A). Dado que el ISR no está implicado en la actividad de ATF4 inducida por TGF $\beta$ , dirigimos las rutas de TGF $\beta$  no canónicas MEK/ERK, PI3K, TAK1 y p38 con inhibidores farmacológicos y TGF $\beta$ 1 en SUM159PT y BT549 durante 24h. La expresión de ATF4 disminuyó después de la inhibición de PI3K y TAK1 (Fig. 3A suplementaria). Un cribado más profundo de la señalización de PI3K en las tres líneas celulares con inhibidores en el co-tratamiento con TGF $\beta$ 1 mostró que PI3K, mTOR y SGK1/2 son independientes de Akt y PDK1. El inhibidor de ATF4 ISRIB se usó como control (Fig. 3B suplementaria). También se probó un segundo inhibidor de PI3K para descartar cualquier efecto indeseado dependiente de inhibidor en ATF4 (Figura 3C complementaria). Para comprobar si la comunicación cruzada entre TGF $\beta$  y Ras upstream PI3K es la señal principal en ATF4, transfectamos las células BT549 y SUM159PT con Ras siRNA con y sin TGF $\beta$ 1. La inhibición de Ras no pudo reprimir los niveles de proteína ATF4 independientemente de la fosforilación de Akt (Fig. 3D Suplementaria).

La rapamicina inhibe mTORC1 y mTORC2 de una manera dependiente de la dosis y del tiempo y SGK1, que se activa con mTORC2. Para aclarar si ATF4 está aguas abajo de mTORC1 y/o mTORC2 en TGF $\beta$  activo, se transfectaron tres líneas celulares TNBC con siRNA Raptor y Rictor

con TGF $\beta$ 1. Se encontró una disminución constante de ATF4 tras el agotamiento de Rictor en las tres líneas celulares (Fig. 6B). La vía TAK1 se descartó ya que no se observó reducción después de su caída en SUM159PT (figura 6B). Debido a que nuestros resultados muestran que Snail está muy reprimido después de la caída de ATF4, se usó como control sustituto de la inhibición de ATF4. Snail disminuyó después de silenciar Rictor con TGF $\beta$ 1 en las tres líneas celulares (Fig. 6C), lo que respalda la idea de que ATF4 está aguas abajo de mTORC2.

La actividad de señalización de mTOR está modulada por varios bucles, y se cuestionó si ATF4 podría retroalimentar sobre mTORC1/2. La expresión de ATF4 se correlacionó con la expresión de mTORC1 (eIF4E, R = 0.463; RPS6, R = 0.380) y dianas mTORC2 (Ndr1, R = 0.213; RhoA, R = 0.320) (P <0.0001) en una cohorte de 2509 pacientes con cáncer de mama (Fig. 6D), lo que reforzó nuestra hipótesis. La retroalimentación positiva sobre mTORC1 y mTORC2 se confirmó posteriormente. ATF4 siRNA inhibió aguas abajo objetivos de mTORC2 (p-Ndr1, RhoA, Rac1) y mTORC1 vía (p-Akt, p-p70S6K) en células SUM159PT y BT549 (Fig. 6E). Curiosamente, RhoA y Rac1 se redujeron consistentemente después del tratamiento con TGF $\beta$ 1 en tres líneas celulares, y la inhibición de Rac1 con TGF $\beta$ 1 se mantuvo en diferentes puntos de tiempo en tres líneas celulares (Fig. 6E y Fig. 3E complementaria).

Colectivamente, nuestros datos sugieren que ATF4 está integrado y regula tanto las vías de señalización canónicas, Smad4 y no canónicas, PI3K/mTORC2/RhoA-Rac1, TGF $\beta$  para modular la metástasis, la pluripotencialidad y la supervivencia de las células tumorales (Fig. 6F).

## **Potencial pronóstico de una firma genética basada en mecanismos en pacientes con cáncer de mama.**

En base a nuestras investigaciones sobre las vías de señalización en las que participa el ATF4, cuestionamos si este conocimiento podría ayudar a mejorar el pronóstico y la toma de decisiones sobre el tratamiento en pacientes con cáncer de mama. Usando la base de datos KM plotter, estudiamos el impacto de diferentes miembros de las rutas TGF $\beta$ /Smad/ATF4 y PI3K/mTOR/ATF4, en el RFS de pacientes con cáncer de mama (Tabla S2 complementaria). Los p-valores falsos positivos de P derivados de KM plotter se filtraron usando un análisis multivariable de incremento. LOOCV se realizó para identificar cualquier efecto dependiente de un solo gen en la supervivencia. Con base en este enfoque, se diseñó una firma de ocho genes (ATF4, TGFBR1, SMAD4, PIK3CA, RPTOR, EIF4EBP1, RICTOR, NDRG1) que predicen un RFS más deficiente en la cohorte de expresión alta frente a la cohorte de baja expresión de pacientes con cáncer de mama cáncer (todas BC, disminución del cambio de 61 veces n = 1764, P <0,005) y cáncer de mama ER (disminución del cambio de 81 veces n = 347, P <0,005) (Fig. 6G). En todas BC, la firma de la invención predice un RFS 27 veces más pobre en comparación con ATF4 (este es el primer candidato individual después de la firma que reduce significativamente el RFS-supervivencia libre de recaída-). En ER-, la firma de la invención predice un RFS 53 veces más

pobre en comparación con NDRG1 (este es el primer candidato individual después de la firma que disminuye significativamente el RFS) (Fig. 6G). LOOCV demostró que el menor RFS en pacientes ER + y TNBC dependía de la expresión de NDRG1, aunque RFS no se determinó para este gen en TNBC (Tabla Suplementaria S2).

- 5 Un análisis adicional de esta firma genética con OncoPrint en una cohorte de 2509 pacientes con cáncer de mama mostró que está alterada en 1138 pacientes (45%) (Figura 3). El porcentaje de alteraciones varió de 4% a 25% para genes individuales (ATF4, 4%; TGFBR1, 4%; SMAD4, 7%; PIK3CA, 7%; RPTOR, 8%; EIF4EBP1, 16%; RICTOR, 6%; NDRG1, 25%). Más importante aún, el análisis de Kaplan-Meier mostró que los pacientes con alteraciones (n = 1055) en esta firma genética tienen peor supervivencia (143 meses) en comparación con los pacientes sin alteraciones (n = 925) (173 meses) (P = 0.00005) (Fig. 6H). El rendimiento de la firma alterada en el análisis de Kaplan-Meier fue validado por LOOCV.

## MATERIALES COMPLEMENTARIOS

### Reactivos

- 15 Inhibidores LY2157299 (5  $\mu$ M, inhibidor de TGF $\beta$ R1 quinasa), U0126 (10  $\mu$ M, inhibidor MEK1 / 2), SB203580 (10  $\mu$ M, inhibidor p38-MAPK), BKM120 (5  $\mu$ M, inhibidor PI3K, isoformas catalíticas p110 $\alpha$  /  $\beta$  /  $\delta$  /  $\gamma$ ), LY294002 (10  $\mu$ M, inhibidor PI3K, isoformas catalíticas p110 $\alpha$  /  $\beta$  /  $\delta$ ), GSK690693 (10  $\mu$ M, inhibidor pan-Akt), rapamicina (10  $\mu$ M, inhibidor mTOR), GSK2334470 (10  $\mu$ M, inhibidor PDK1), BI-D1870 (10  $\mu$ M, inhibidor pan-RSK), GSK650394 (10  $\mu$ M, inhibidor SGK1 / 2), CHIR-99021 (10  $\mu$ M, inhibidor GSK3 $\alpha$  /  $\beta$ ), ISRIB (5  $\mu$ M, respuesta de estrés integrada, o ISR, inhibidor) se compraron de MedChem Express y (5Z) -7-Oxozeaenol de (1  $\mu$ M, inhibidor de Tak1) Sigma. El factor de crecimiento transformante recombinante humano  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) se obtuvo de Preprotech. Trilencer-27 Se obtuvieron siRNAs humanos para ATF4 y control codificado (SCR) de Origene. Los siRNAs para Smad2 / 3, Smad4, PERK, PKR, GCN2, HRI, eIF2 $\alpha$ , Raptor, Rictor y Tak1 se compraron de Santa Cruz Biotechnology. Ras siRNA era de Sigma. Para estudios in vivo, el siRNA n.º 2 para ATF4 y el control SCR (secuencias de Origene) se sintetizaron por Sigma. DOPC (1,2 -dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina) se adquirió de Avanti Polar Lipids (Alabaster). Docetaxel se obtuvo de la farmacia del Houston Methodist Hospital.

- Anticuerpos para ATF4 (CREB-2, C-20 y B-3), Smad4 (B-8), Twist1 (Twist2C1a), Bcl2 (C-2), Mcl1 (22), CD44 (HCAM, DF1485), Sox2 (E-4), HRI (D12), Raptor (10E10), Rictor (H-11), Tak1 (H-5) y RhoA (26C4) eran de Santa Cruz.  $\beta$ -Actina, fosfo-Smad2 (Ser465 / 467) / 3 (Ser423 / 425) (D27F4), Smad2 / 3, N-Cadherina (D4R1H), Zeb1 (D80D3), Caracol (C15D3), Slug (C19G7), Nanog (D73G4), Notch1 escindido (Val1744) (D3B8), Oct4, PERK (C33E10), PKR, GCN2, eIF2 $\alpha$ , fosfo-Akt (Ser473), fosfo-p70S6K (Thr389), fosfo-NDRG1 (Thr346), Ras eran de Cell Signaling y Rac1 (102) de BD Biosciences.

OS (Not censored)	Cases	n	Low-expression cohort (months)	High-expression cohort (months)	P value (¥ Log-rank)
ATF4	All BC	1402	110	67	<b>0.0122</b> ¥
Smad4	All BC	626	68	90	0.2709
Smad2	All BC	626	85	78	0.2707
Smad3	All BC	1402	71	121	<b>0.0103</b> ¥
TGFBR1	All BC	626	95	64	<b>0.0367</b> ¥
Smad4/2	All BC	626	121	77	0.2388
Smad4/3	All BC	626	70	107	0.0954
Smad2/3	All BC	626	70	108	0.0974
Smad4/2/3	All BC	626	70	107	0.191
Smad4 + TGFBR1	All BC	626	90	70	0.2427
Smad2 + TGFBR1	All BC	626	90	64	0.0753
Smad3 + TGFBR1	All BC	626	90	64	0.0645
Smad4/2 + TGFBR1	All BC	626	90	74	0.3233
Smad4/3 + TGFBR1	All BC	626	89	74	0.5581
Smad2/3 + TGFBR1	All BC	626	90	66	0.1312
Smad4/2/3 + TGFBR1	All BC	626	90	79	0.3343
ATF4 + Smad4	All BC	626	100	52	<b>0.002</b> ¥*†
ATF4 + Smad2	All BC	626	107	52	<b>0.0016</b> ¥*†
ATF4 + Smad3	All BC	1402	110	66	<b>0.0038</b> ¥*†
ATF4 + TGFBR1	All BC	626	137	64	<b>0.0003</b> ¥*†

OS: Overall Survival. All BC: All types of Breast Cancer. \* Significant with multivariate analysis.  
† Does not meet Leave-one-out cross-validation.

Tabla Suplementaria S1. Supervivencia global en cohortes de baja y alta expresión.

RFS (Not censored)	Cases	n	Low-expression cohort (months)	High-expression cohort (months)	P value (≠ Log-rank)	FC
<b>Signature</b>	All BC	1764	46	18	<b>1E-16</b> ¥*	<b>-61</b>
ATF4	All BC	3951	55	36	<b>2.7E-5</b> ¥*	<b>-34</b>
TGFBR1	All BC	1764	39	28	0.054	-27
SMAD4	All BC	1764	23	44	<b>2.9E-11</b> ¥*	<b>95</b>
PIK3CA	All BC	3951	217	184	<b>2.1E-9</b> ¥*	<b>-15</b>
RICTOR	All BC	1764	25	41	<b>6.1E-9</b> ¥*	<b>62</b>
RPTOR	All BC	1764	27	41	<b>5E-4</b> ¥*	<b>51</b>
4EBP1	All BC	3951	217	163	<b>1E-16</b> ¥*	<b>-25</b>
NDRG1	All BC	3951	217	160	<b>1E-16</b> ¥*	<b>-26</b>
<b>Signature</b>	ER-	347	171	32	<b>4.7E-8</b> ¥*	<b>-81</b>
ATF4	ER-	801	161	126	<b>5E-3</b> ¥*	<b>-22</b>
TGFBR1	ER-	801	171	58	<b>1.59E-2</b> ¥	<b>-66</b>
SMAD4	ER-	347	171	63	0.15	-63
PIK3CA	ER-	801	30	29	0.1594	-3
RICTOR	ER-	347	18	29	0.2407	58
RPTOR	ER-	347	171	58	0.0529	-66
4EBP1	ER-	801	145	171	0.2061	19
NDRG1	ER-	801	171	123	<b>5.5E-4</b> ¥*	<b>-28</b>
<b>Signature</b>	ER+	762	107	55	<b>5.6E-4</b> ¥*†	<b>-49</b>
ATF4	ER+	2061	81	56	<b>3.2E-3</b> ¥*	<b>-31</b>
TGFBR1	ER+	762	59	110	<b>8E-4</b> ¥*	<b>87</b>
SMAD4	ER+	762	61	110	<b>5.4E-3</b> ¥	<b>81</b>
PIK3CA	ER+	2061	217	229	0.0761	6
RICTOR	ER+	762	65	92	0.0514	41
RPTOR	ER+	762	111	60	<b>2.3E-3</b> ¥*	<b>-46</b>
4EBP1	ER+	2061	217	152	<b>4.3E-10</b> ¥*	<b>-30</b>
†NDRG1	ER+	2061	217	184	<b>1.8E-4</b> ¥*†	<b>-15</b>
<b>Signature</b>	TNBC	161	57	16	<b>1E-5</b> ¥*†	<b>-72</b>
ATF4	TNBC	255	36	22	<b>2.34E-2</b> ¥	<b>-40</b>
TGFBR1	TNBC	161	55	29	0.1861	-47
SMAD4	TNBC	161	26	36	0.2227	39
PIK3CA	TNBC	255	25	36	0.2273	46
RICTOR	TNBC	161	18	43	<b>8.1E-3</b> ¥*	<b>143</b>
RPTOR	TNBC	161	57	22	<b>2.52E-2</b> ¥	<b>-61</b>
4EBP1	TNBC	255	36	22	<b>3.5E-2</b> ¥	<b>-39</b>
NDRG1	TNBC	255	NA	NA	<b>1.4E-4</b> ¥†	NA

RFS: Relapse Free Survival. ER: Estrogen Receptor. All BC: All types of Breast Cancer. TNBC: triple negative breast cancer. FC: Fold Change. NA: Not Available. \* Significant with multivariate analysis. † Does not meet Leave-one-out cross-validation.

**Tabla Suplementaria S2.** Supervivencia libre de recaídas de la firma genética y genes únicos.

### REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de ATF4 para predecir o pronosticar la supervivencia global en un individuo con cáncer y/o para predecir o pronosticar la supervivencia libre de recaídas en un individuo con cáncer.
- 5 2.- Uso de *ATF4* y al menos un gen seleccionado de entre *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1* y *EIF4EBP1*, preferentemente todos ellos, para predecir o pronosticar la supervivencia libre de recaídas en un individuo con cáncer.
- 3.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 donde el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de hígado, carcinoma esofágico de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo.
- 10 4.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el cáncer es cáncer de mama.
- 5.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el cáncer es cáncer de mama receptor de estrógenos negativo y triple negativo.
- 15 6.- Un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la supervivencia global en un individuo con cáncer y/o para predecir o pronosticar la supervivencia libre de recaída en un individuo con cáncer, que comprende
- a) obtener una muestra biológica aislada del individuo,
- b) detectar el producto de expresión de ATF4
- 20 7.- Un método de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la supervivencia libre de recaída en un individuo con cáncer, que comprende
- a) obtener una muestra biológica aislada del individuo,
- b) detectar el producto de expresión de *ATF4* y al menos un gen seleccionado de entre *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1* y *EIF4EBP1*, preferentemente el de todos ellos.
- 25 8.- Un método para predecir o pronosticar la supervivencia global en un individuo con cáncer y/o para predecir o pronosticar la supervivencia libre de recaída en un individuo con cáncer, que comprende los pasos (a) y (b) según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, y además comprende:
- c) asignar al individuo al grupo de individuos con una menor supervivencia global cuando ATF4 presenta una expresión superior, o sobreexpresión, respecto a una muestra de referencia, y/o

- c1) asignar al individuo al grupo de individuos con una menor supervivencia libre de recaídas cuando ATF4 presenta una expresión superior, o sobreexpresión, respecto a una muestra de referencia, y/o
- c2) asignar al individuo al grupo de individuos con una menor supervivencia libre de recaídas cuando ATF4 y al menos un gen seleccionado de entre *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1* y *EIF4EBP1*, preferentemente todos ellos, presentan una expresión superior, o sobreexpresión, respecto a una muestra de referencia.
- 9.- Un método para predecir o pronosticar la supervivencia global en un individuo con cáncer y/o para predecir o pronosticar la supervivencia libre de recaída en un individuo con cáncer, que comprende los pasos (a) y (b) según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, y además comprende:
- c) asignar al individuo que presenta una expresión de ATF4 igual o mayor a aproximadamente el cuartil alto de expresión al grupo de individuos con una menor supervivencia global, y/o
- c1) asignar al individuo que presenta una expresión de ATF4 igual o mayor a aproximadamente el tercil alto de expresión al grupo de individuos con una menor supervivencia libre de recaídas, y/o
- c2) asignar al individuo con cáncer de mama positivo para receptor de estrógeno (ER+) que presenta una expresión de ATF4 igual o mayor a aproximadamente el tercil alto de expresión al grupo de individuos con una menor supervivencia libre de recaídas, y/o
- c3) asignar al individuo cáncer de mama negativo para receptor de estrógenos (ER-) que presenta una expresión de ATF4 igual o mayor a aproximadamente el cuartil alto de expresión al grupo de individuos con una menor supervivencia libre de recaídas, y/o
- c4) asignar al individuo cáncer de mama triple negativo que presenta una expresión de ATF4 igual o mayor a aproximadamente el cuartil alto de expresión al grupo de individuos con una menor supervivencia libre de recaídas.
- c5) asignar al individuo con cáncer de mama (sin distinción de subtipos) que presenta una expresión media del conjunto de ATF4 y al menos un gen seleccionado de entre *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1* y *EIF4EBP1*, preferentemente el conjunto formado por todos ellos, igual o mayor que el cuartil bajo de expresión al grupo de individuos con una menor supervivencia libre de recaídas.
- c6) asignar al individuo con cáncer de mama ER- que presenta una expresión media del conjunto de ATF4 y al menos un gen seleccionado de entre *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1* y *EIF4EBP1*, preferentemente la expresión media del conjunto formado por todos ellos,

igual o mayor que el tercil bajo de expresión al grupo de individuos con una menor supervivencia libre de recaídas.

10.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 6-9 donde la muestra son células o tejidos tumorales, o biopsia líquida.

5 11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 6-9 donde la detección del producto de expresión se realiza mediante RT-PCR.

12.- Un kit o dispositivo, que comprende los elementos necesarios para detectar el producto de expresión de *ATF4* y al menos un gen seleccionado de entre *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1* y *EIF4EBP1*, preferentemente todos ellos.

10 13.- Un kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de detectar el producto de expresión de *ATF4* y al menos un gen seleccionado de entre *TGFBR1*, *SMAD4*, *PIK3CA*, *RPTOR*, *RICTOR*, *NDRG1* y *EIF4EBP1*, preferentemente de todos ellos, y donde:

- los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 y/o SEQ ID NO:15;

- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 80 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 200 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 13 y/o SEQ ID NO:15;

- los anticuerpos son capaces de unirse específicamente a una región formada por cualquiera de las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14 y/o SEQ ID NO: 16.

14.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, donde los cebadores, sondas o anticuerpos están modificados.

15.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 12 - 14, que además comprende todos aquellos elementos necesarios para llevar a cabo un procedimiento RT-PCR.

16.- Uso del kit o dispositivo tal y como se define en las reivindicaciones 12-15, para la obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la supervivencia global en un individuo con cáncer y/o para predecir o pronosticar la supervivencia libre de recaída en un individuo con cáncer.

5

FIGURE 1

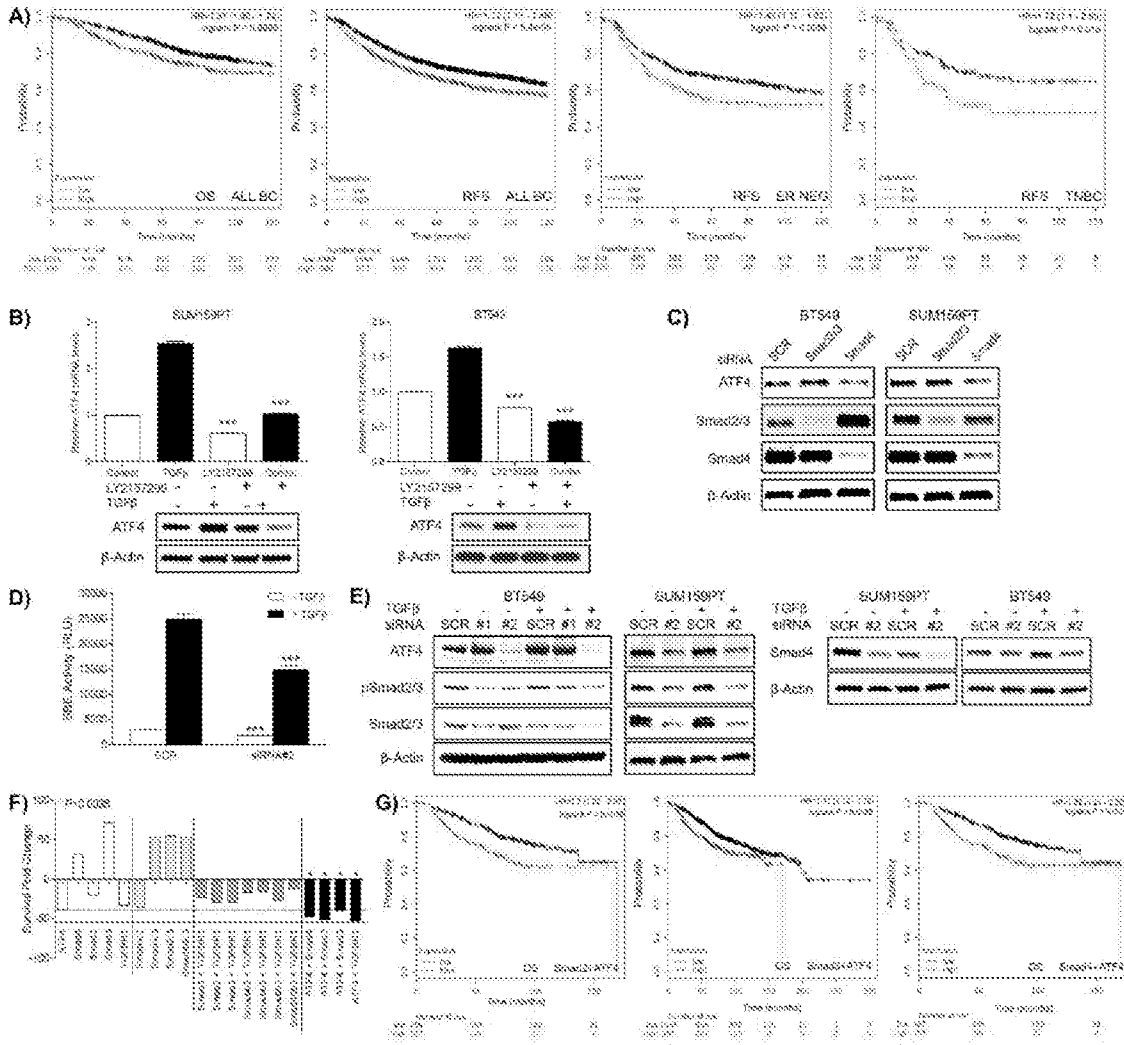
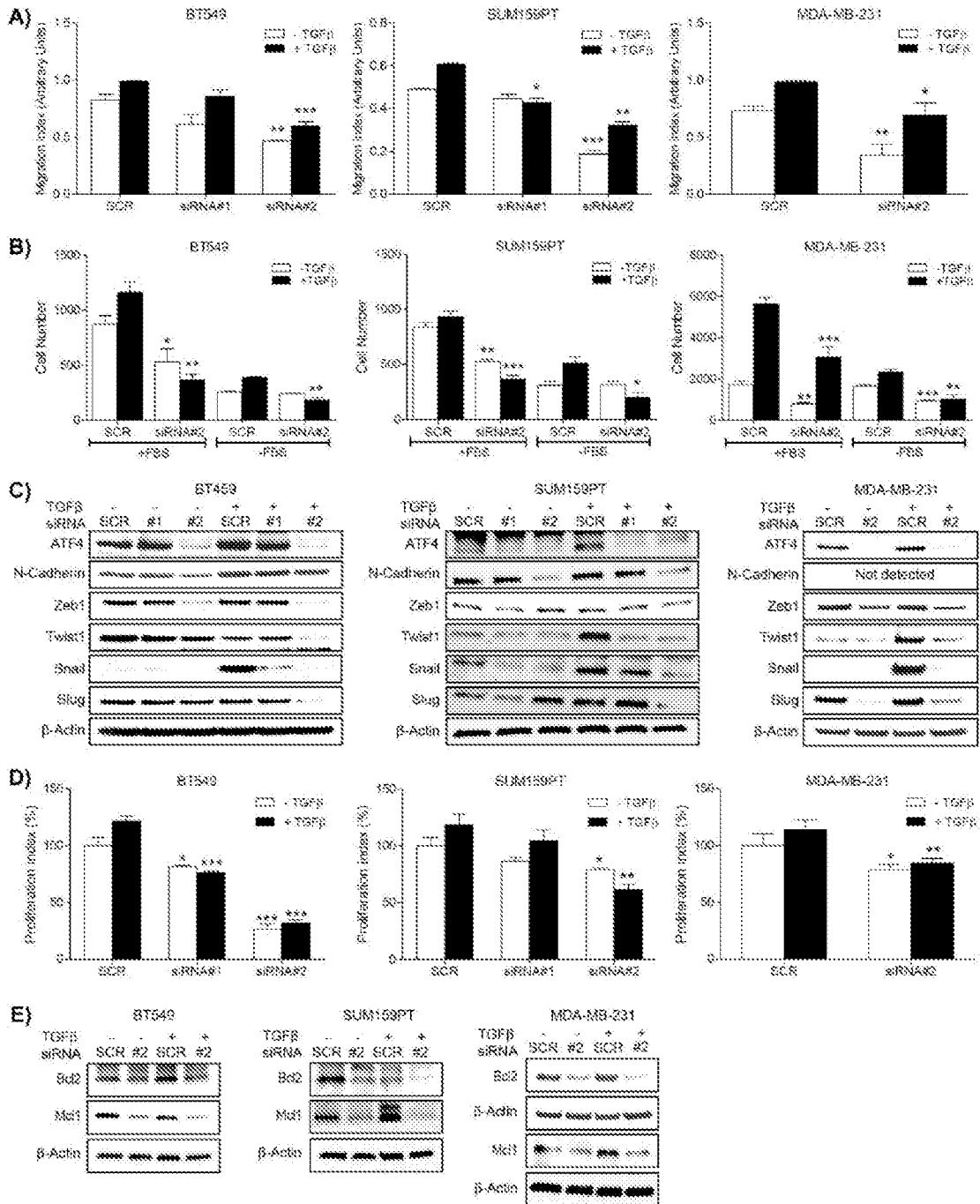
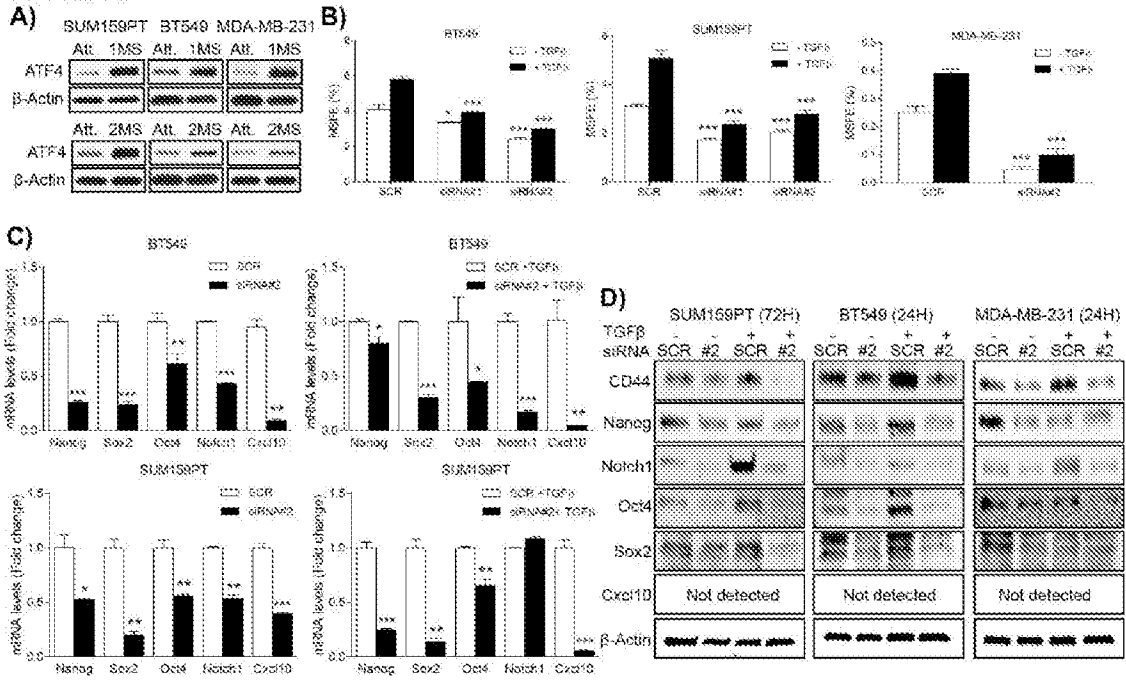


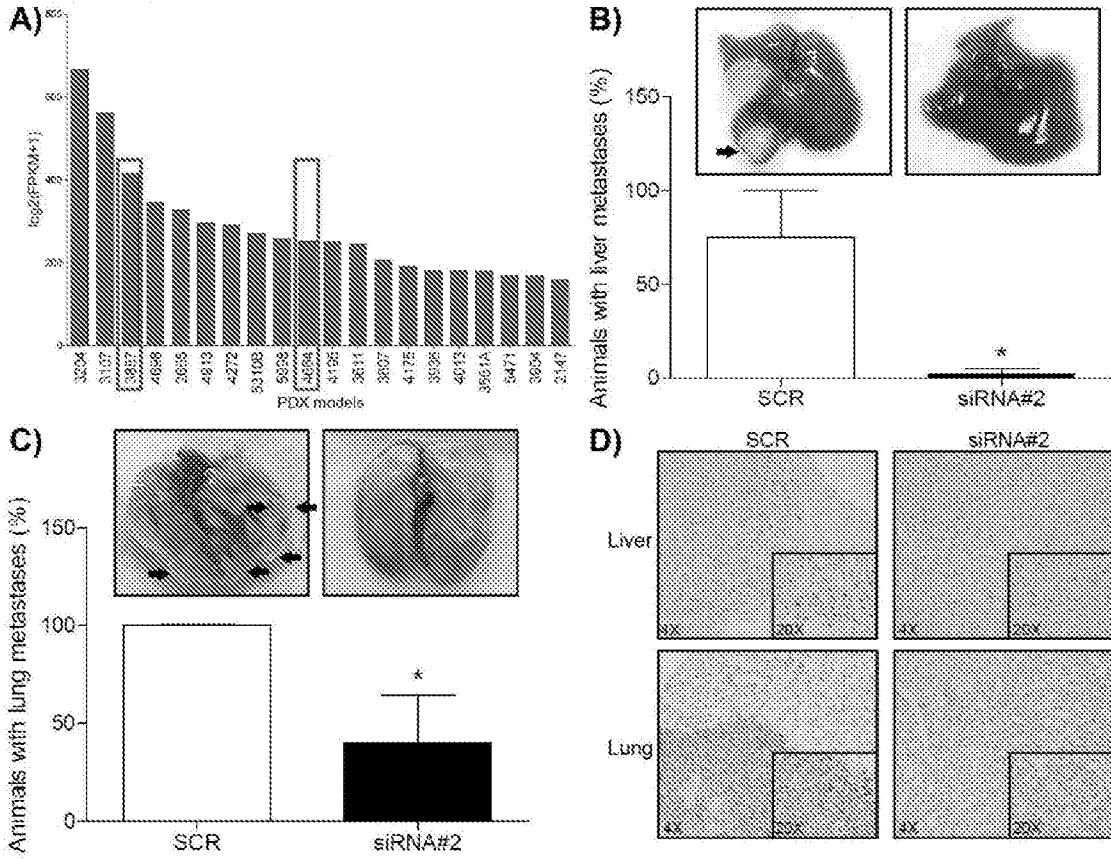
FIGURE 2



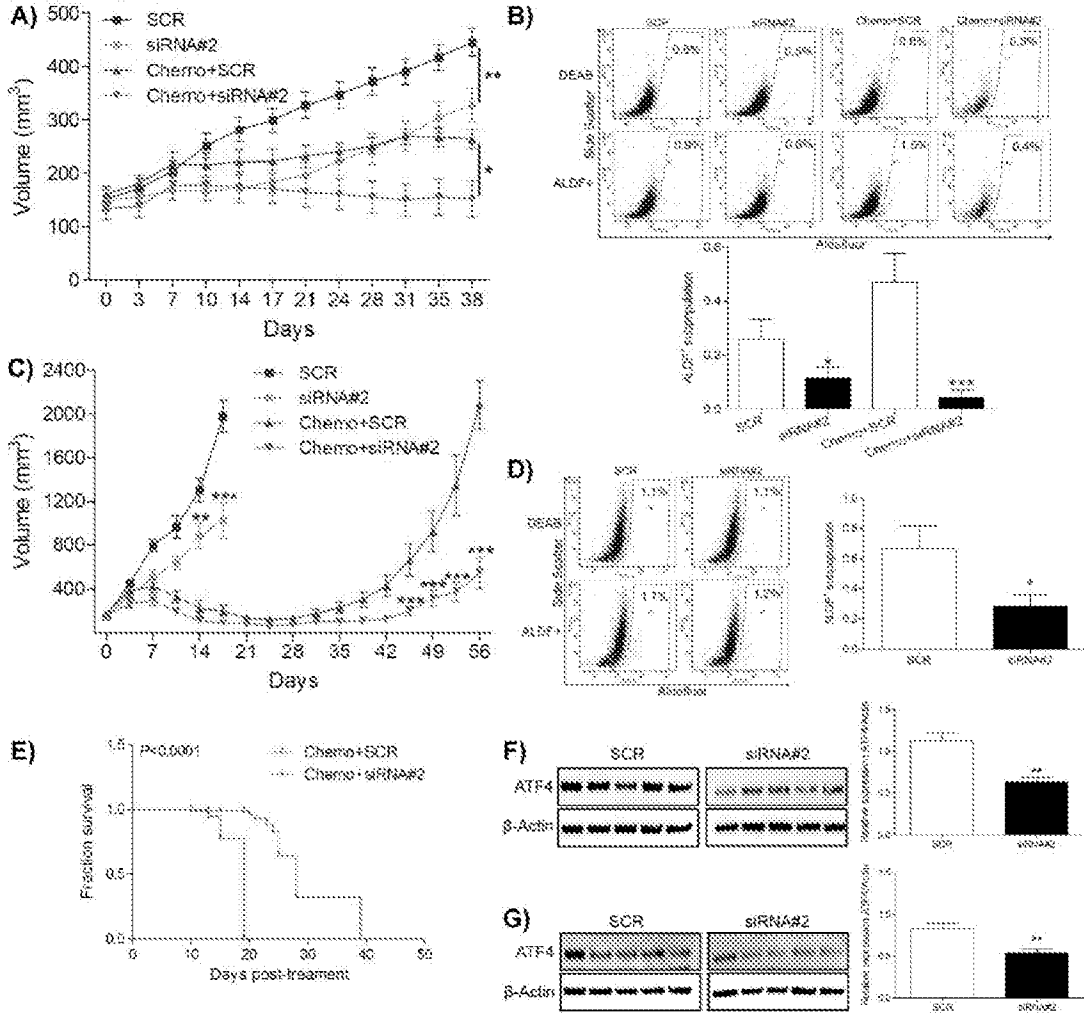
**FIGURE 3**



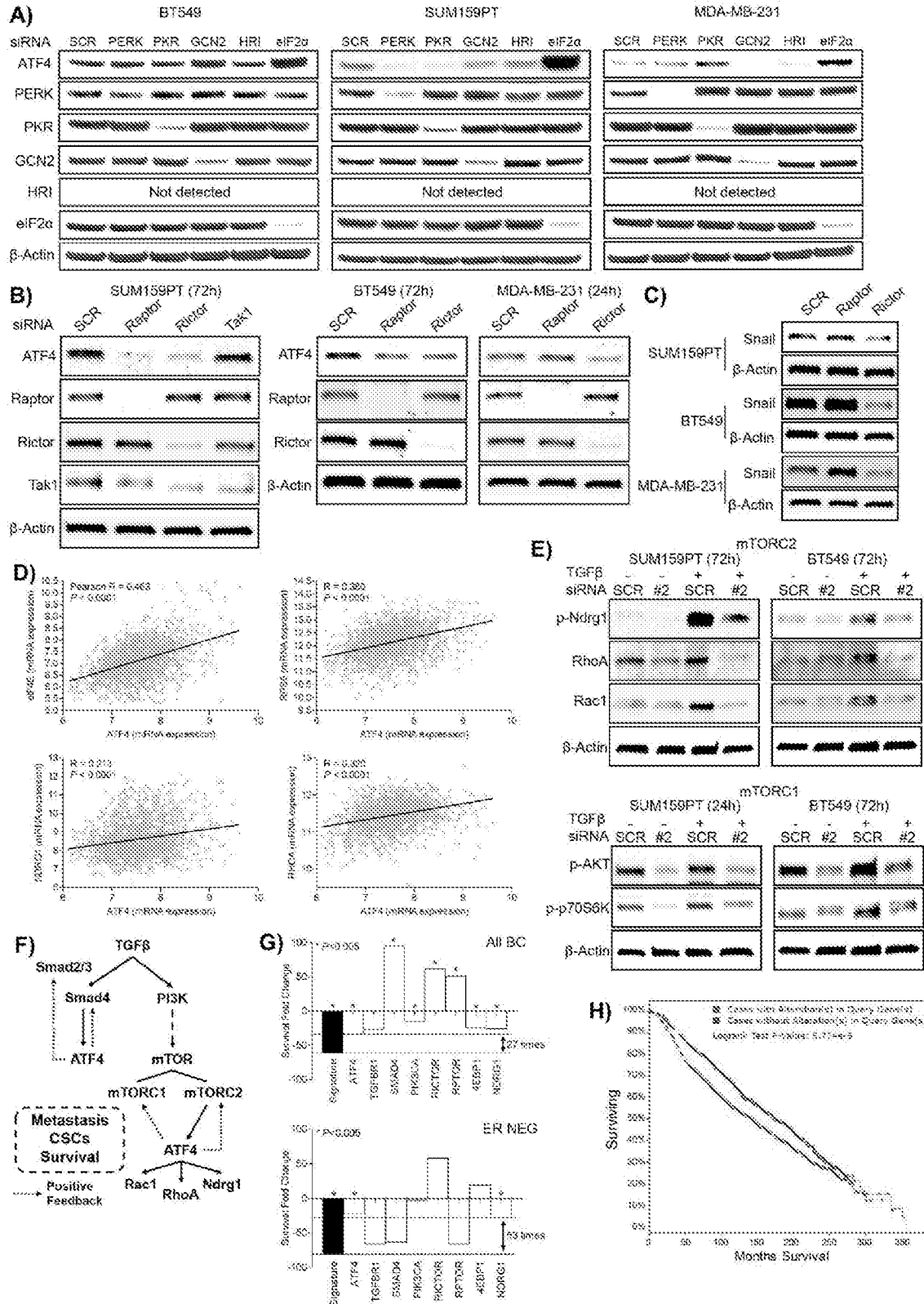
**FIGURE 4**



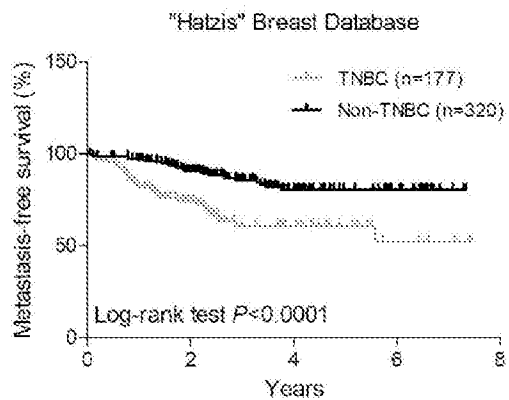
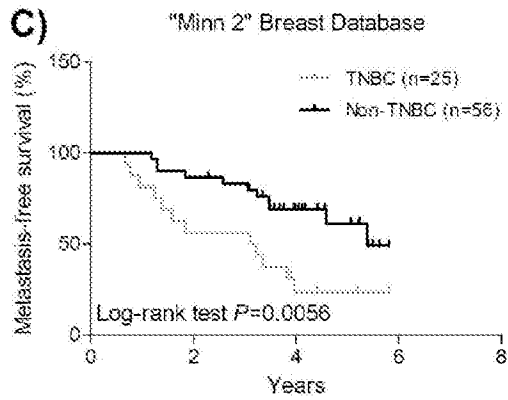
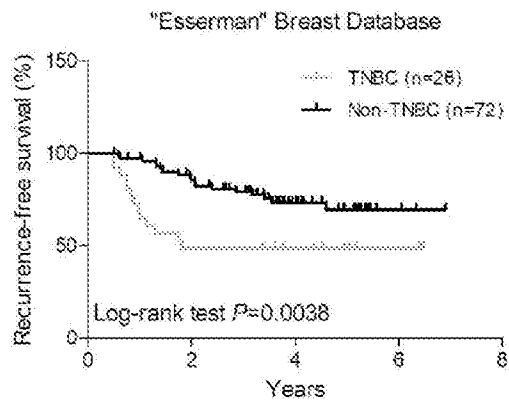
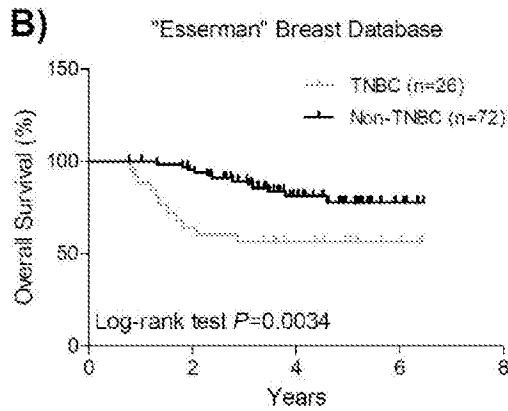
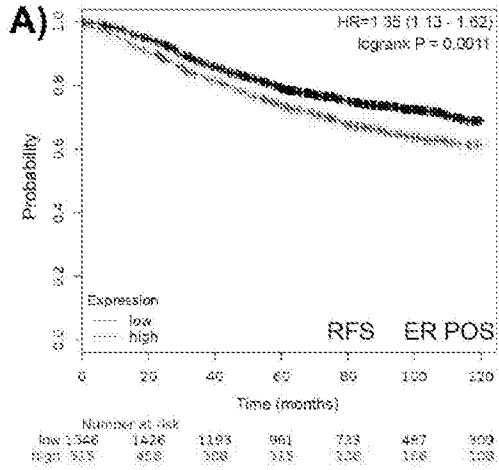
**FIGURE 5**



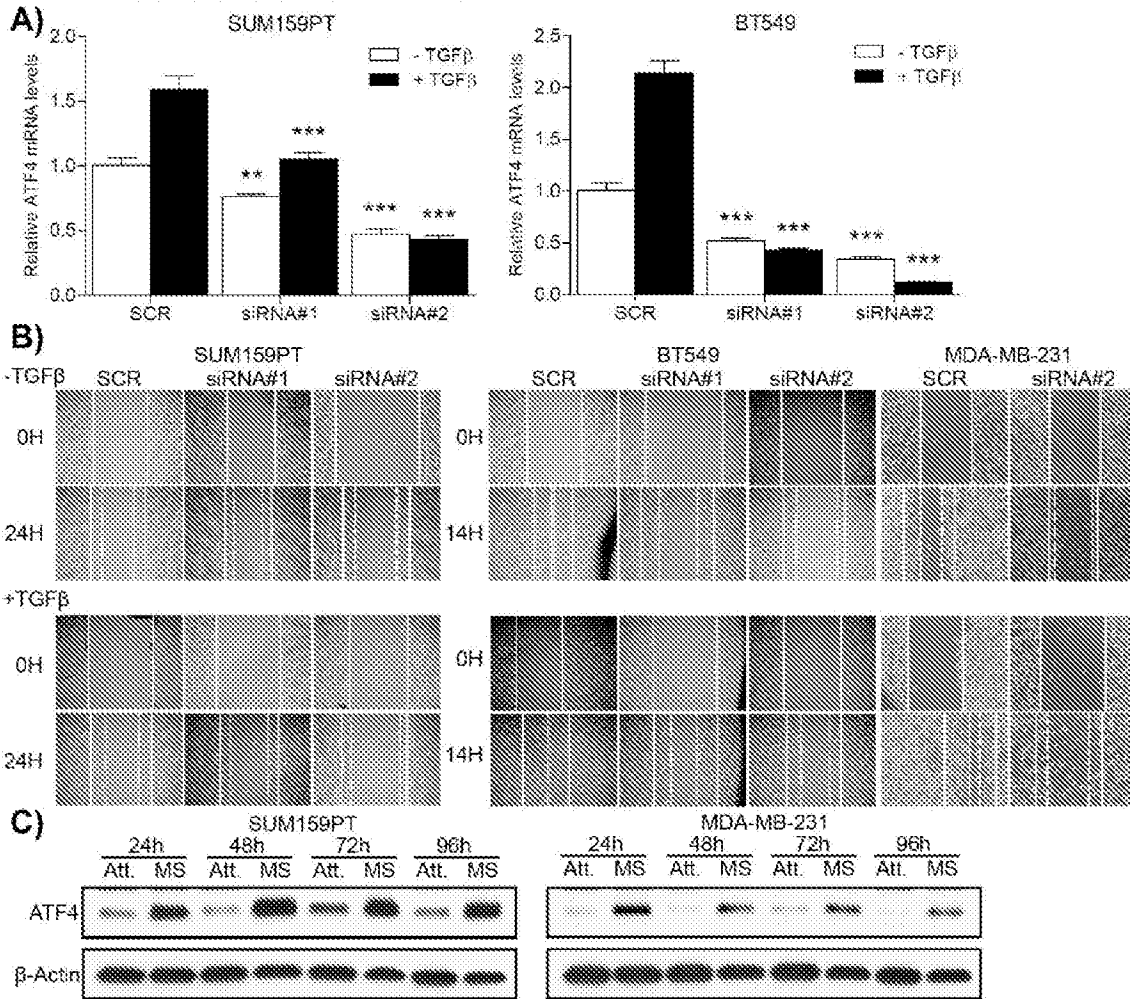
**FIGURE 6**



**SUPPLEMENTARY FIGURE 1**



**SUPPLEMENTARY FIGURE 2**



**SUPPLEMENTARY FIGURE 3**

