

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 975 770**

51 Int. Cl.:

C12N 5/095 (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2019** **PCT/US2019/024097**
87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2019** **WO19191115**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2019** **E 19774552 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024** **EP 3775171**

54 Título: **Métodos de tratamiento de cáncer residual mínimo**

30 Prioridad:

26.03.2018 US 201862648166 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
15.07.2024

73 Titular/es:

**ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI
(100.0%)
One Gustave L. Levy Place
New York, NY 10029, US**

72 Inventor/es:

AGUIRRE-GHISO, JULIO, A.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la
Oficina Europea de Patentes

ES 2 975 770 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de tratamiento de cáncer residual mínimo

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 62/648.166, presentada el 26 de marzo de 2018.

La presente invención se realizó con financiación gubernamental en virtud de R01 CA109182, U54 CA16131 y P30 CA196521 concedida por el Instituto Nacional de Salud/Instituto Nacional del Cáncer y BC 132674 concedida por los
10 Programas de Investigación Médica Dirigidos por el Departamento de Defensa. El gobierno posee determinados derechos sobre la invención.

Campo

- 15 La presente divulgación se refiere a compuestos para su uso en métodos de tratamiento de cáncer residual mínimo en un sujeto.

Antecedentes

- 20 El desplegamiento de proteínas en el lumen del retículo endoplásmico ("RE") activa tres vías principales, PERK, IRE1 α y ATF6, también conocidas como respuesta a proteínas desplegadas ("RPD"), lo que permite a las células sobrevivir a este estrés y corregirlo (Walter et al., "The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation", *Science* 334:1081-1086 (2011) y Ron et al., "Signal Integration In the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:519-529 (2007)). Pruebas recientes sugieren que en varios tipos de
25 cáncer la RPD es un mecanismo que permite a las células tumorales responder a las demandas sobre el RE y a las condiciones oxidativas impuestas por una mayor carga traslacional causada por los oncogenes y la hipoxia, entre otras señales (Blais et al., "Activating Transcription Factor 4 is Translationally Regulated by Hypoxic Stress", *Mol. Cell. Biol.* 24:7469-7482 (2004); Chevet et al., "Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Cell Reprogramming in Oncogenesis", *Cancer Discov.* 5:586-597 (2015); Tameire et al., "Cell Intrinsic and Extrinsic Activators of the Unfolded Protein Response in Cancer: Mechanisms and Targets for Therapy", *Semin. Cancer Biol.* 33:3-15 (2015); Hart et al., "ER Stress-Mediated Autophagy Promotes Myc-Dependent Transformation and Tumor Growth", *J. Clin. Invest.* 122:4621-4634 (2012); Martin-Perez et al., "Activated ERBB2/HER2 Licenses Sensitivity to Apoptosis Upon Endoplasmic Reticulum Stress Through a PERK-Dependent Pathway", *Cancer Res.* 74:1766-1777 (2014); Rajasekhar et al., "Postgenomic Global Analysis of Translational Control Induced by Oncogenic Signaling", *Oncogene* 23:3248-3264 (2004); Rajasekhar et al., "Oncogenic Ras and Akt Signaling Contribute to Glioblastoma Formation by Differential Recruitment of Existing mRNAs to Polysomes", *Mol. Cell* 12:889-901 (2003); Rojo et al., "4E-Binding Protein 1, A Cell Signaling Hallmark in Breast Cancer that Correlates With Pathologic Grade and Prognosis", *Clin. Cancer Res.* 13:81-89 (2007); y Sequeira et al., "Inhibition of eIF2 α Dephosphorylation Inhibits ErbB2-Induced Deregulation of Mammary Acinar Morphogenesis", *BMC Cell Biol.* 10:64 (2009)). Las vías activadas por oncogenes aumentan la carga
40 de proteínas cliente del RE al activar la señalización de mTOR y el inicio de la traducción (Hart et al., "ER Stress-Mediated Autophagy Promotes Myc-Dependent Transformation and Tumor Growth", *J. Clin. Invest.* 122:4621-4634 (2012); Ozcan et al., "Loss of the Tuberous Sclerosis Complex Tumor Suppressors Triggers the Unfolded Protein Response to Regulate Insulin Signaling and Apoptosis", *Mol. Cell* 29:541-551 (2008); y Tameire et al., "Cell Intrinsic and Extrinsic Activators of the Unfolded Protein Response in Cancer: Mechanisms and Targets for Therapy", *Semin. Cancer Biol.* 33:3-15 (2015)). Se ha demostrado además que las vías PERK e IRE1 α -XBP-1 contribuyen a la adaptación a la hipoxia y al estrés microambiental (Bi et al., "ER Stress-Regulated Translation Increases Tolerance to Extreme Hypoxia and Promotes Tumor Growth", *EMBO J.* 24:3470-3481 (2005); Blais et al., "Activating Transcription Factor 4 is Translationally Regulated by Hypoxic Stress", *Mol. Cell. Biol.* 24:7469-7482 (2004); Chen et al., "XBP1 Promotes Triple-Negative Breast Cancer by Controlling the HIF1 α Pathway", *Nature* 508:103-107 (2014); Romero-Ramirez et al., "X box-Binding Protein 1 Regulates Angiogenesis in Human Pancreatic Adenocarcinomas", *Transl. Oncol.* 2:31-38 (2009); Rouschop et al., "The Unfolded Protein Response Protects Human Tumor Cells During Hypoxia Through Regulation of the Autophagy Genes MAP1LC3B and ATG5", *J. Clin. Invest.* 120:127-141 (2010); Schewe et al., "ATF6 α -Rheb-mTOR Signaling Promotes Survival of Dormant Tumor Cells *In Vivo*", *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 105:10519-10524 (2008); y Ye et al., "The GCN2-ATF4 Pathway is Critical for Tumour Cell Survival and Proliferation in Response to Nutrient Deprivation", *EMBO J.* 29:2082-2096 (2010)), lo que sugiere que la RPD puede
55 permitir la adaptación al medio cambiante.

La activación de PERK coordina una respuesta antioxidante y de autofagia para proteger a las células epiteliales mamarias durante la pérdida de adhesión a la membrana basal (Avivar-Valderas et al., "PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress Responses to Promote Survival During Extracellular Matrix Detachment", *Mol. Cell. Biol.* 31:3616-3629 (2011)). Esta respuesta de supervivencia implica un programa transcripcional ATF4 y CHOP (Avivar-Valderas et al., "PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress Responses to Promote Survival During Extracellular Matrix Detachment", *Mol. Cell. Biol.* 31:3616-3629 (2011)) acoplado a una rápida activación de la vía LKB1-AMPK-TSC2 que inhibe mTOR (Avivar-Valderas et al., "Regulation of Autophagy during ECM Detachment is Linked to a Selective Inhibition of mTORC1 by PERK", *Oncogene* 32(41):4932-40 (2013)). En el CDIS humano, las lesiones mostraron una mayor fosforilación y autofagia de PERK (Avivar-Valderas et al., "PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress

Responses to Promote Survival During Extracellular Matrix Detachment", Mol. Cell. Biol. 31:3616-3629 (2011) y Espina et al., "Malignant Precursor Cells Pre-Exist in Human Breast DCIS and Require Autophagy for Survival", PloS One 5:e10240 (2010)) y la ablación condicional de PERK en el epitelio mamario retrasó la carcinogénesis mamaria promovida por el oncogén HER2 (Bobrovnikova-Marjon et al., "PERK Promotes Cancer Cell Proliferation and Tumor Growth by Limiting Oxidative DNA Damage", Oncogene 29:3881-3895 (2004) y Bobrovnikova-Marjon et al., "PERK-Dependent Regulation of Lipogenesis During Mouse Mammary Gland Development and Adipocyte Differentiation", Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 105:16314-16319 (2008)). Asimismo, HER2 aumenta los niveles de proteotoxicidad en las células tumorales activando la señalización de JNK e IRE y permitiendo que las células de cáncer HER2⁺ afronten este estrés (Singh et al., "HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive", Sci. Signal. 8:ra52 (2015)). Por consiguiente, la base de datos cBio (Cerami et al., "The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data", Cancer Discov. 2:401-404 (2012)), mostró que -14 % de los tumores de mama humanos amplificados con HER2 presentaban regulación positiva del ARNm de PERK, corroborando la idea de que, para sobrevivir, los tumores HER2⁺ podían depender de PERK y/o de otras vías de RPD.

También se ha demostrado que las células tumorales latentes (inactivas) dependen de la señalización de PERK y ATF6 para sobrevivir (Ranganathan et al., "Dual Function of Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase in Tumor Cell Growth Arrest and Survival", Cancer Res. 68:3260-3268 (2008); Ranganathan et al., "Functional Coupling of p38-Induced Up-Regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells", Cancer Res. 66:1702-1711 (2006); y Schewe et al., "ATF6alpha-Rheb-mTOR Signaling Promotes Survival of Dormant Tumor Cells *In Vivo*", Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 105:10519-10524(2008)). Las células cancerosas diseminadas ("CCD") de páncreas inactivas en el hígado también presentaron una RPD dependiente de PERK que se relacionó con la pérdida de expresión de E-cadherina y con la regulación negativa de MHC-I, favoreciendo la evasión inmunitaria durante la latencia (Pommier et al., "Unresolved Endoplasmic Reticulum Stress Engenders Immune-Resistant, Latent Pancreatic Cancer Metastases", Science 360(6394):eaao4908 (2018)). En el modelo MMTV-HER2 (expresión de HER2 bajo el promotor del virus del tumor mamario murino, *murine mammary tumor virus*), también se descubrió que las CCD inactivas en la médula ósea y en los pulmones eran negativas a E-cadherina (Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2⁺ Mammary Cancer", Nature 540:588-592 (2016)) pero no se comprobó la relación con la RPD. En conjunto, estos datos sugieren que la RPD puede servir como un mecanismo de supervivencia adaptativo microambiental inmunitario y de estrés para las CCD.

La presente divulgación está dirigida a superar las deficiencias de la técnica. Kobayashi et al (2011) J Exp Med 208(13):2641-2655 hacen referencia a la proteína morfogenética ósea 7 en la latencia y metástasis de células madre de tipo cáncer de próstata en el hueso.

Buijs et al (2007) Am J Pathol 171(3):1047-1057 comentan que la proteína BMP7, un supuesto regulador de la homeostasis epitelial en la próstata humana, es un fuerte inhibidor de la metástasis ósea del cáncer de próstata *in vivo*.

En el documento WO 2005/030933 A2 se hace referencia a métodos para diagnosticar y tratar el cáncer basados en la propiedad de la proteína morfogenética ósea-7 (BMP-7) de inhibir o invertir la progresión de una célula cancerosa a un estado más maligno.

Buijs et al (2007) Clin Exp Metastasis 24(8):609-617 hacen referencia a las interacciones de TGF-beta y BMP7 en la progresión tumoral y la metástasis ósea.

Boon et al (2011) Cytokine Growth Factor Rev 22(4):221-229 hacen referencia a la proteína morfogenética ósea 7: un factor de crecimiento de amplio espectro con fuerza terapéutica en múltiples dianas.

Buijs et al (2012) Oncogene 31(17):2164-2174 comentan que el heterodímero BMP2/7 inhibe la subpoblación de células madre de cáncer de mama humano y la formación de metástasis óseas.

Aguirre-Ghiso et al (2013) Nat Med 19(3):276-277 hacen referencia a la lucha contra el cáncer latente.

Tate et al (2012) Cell Death Differ 19(10):1644-1654 comentan que una variante de BMP7 inhibe el potencial tumorigénico de las células madre de tipo glioblastoma.

Sandoval et al analizan la inhibición de PERK como una posible terapia para las células tumorales latentes solitarias inducidas por hipoxia (en: Proceedings of the AACR Special Conference on Tumor Metastasis; 30 de nov. - 3 de dic. de 2015; Austin, TX. Filadelfia (PA): AACR; Cancer Res 2016;76(7 Suppl): Resumen n.º A45).

Sosa et al (2014) Nat Rev Cancer 14(9):611-622 hacen referencia a los mecanismos de latencia de las células cancerosas diseminadas.

En el documento US 2010/0167945 A1 se hace referencia a composiciones y métodos para detectar los estados de activación de componentes de vías de transducción de señales en células tumorales.

En el documento WO 2018/194885 A1 se hace referencia a compuestos de fenil-2-hidroxi-acetilamino-2-metil-fenilo, a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, y a métodos de uso de los compuestos para tratar trastornos fisiológicos tales como el cáncer.

Sumario

La invención es como se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. Las referencias en esta descripción a métodos de tratamiento mediante terapia deben interpretarse como referencias a compuestos de la presente invención

para su uso en esos métodos. De otro modo, en el presente documento se desvela un método de tratamiento de un cáncer residual mínimo en un sujeto, cuyo método implica poner en contacto células cancerosas diseminadas (CCD) de un sujeto con una proteína derivada de la proteína morfogenética ósea 7 ("BMP7"), donde dicho contacto induce o mantiene la latencia en las CCD del sujeto que se han puesto en contacto para tratar un cáncer residual mínimo en el sujeto. Pueden utilizarse métodos de este aspecto para impedir que un cáncer residual mínimo progrese hasta un crecimiento agresivo en el sujeto.

Las reivindicaciones se refieren a un inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK) para su uso en un método de tratamiento de cáncer residual mínimo en un sujeto, cuyo método implica poner en contacto células cancerosas diseminadas (CCD) de un sujeto con un inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa ("PERK") seleccionado de LY2, LY3 y LY4, donde dicha puesta en contacto erradica las CCD del sujeto para tratar un cáncer residual mínimo del sujeto.

De otro modo, en el presente documento se desvela otro aspecto que se refiere a un método de tratamiento de un cáncer en estadio terminal en un sujeto. Este método implica poner en contacto células cancerosas diseminadas (CCD) de un sujeto con un inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK) seleccionado de LY2, LY3 y LY4, donde dicha puesta en contacto erradica las CCD del sujeto para tratar un cáncer en estadio terminal del sujeto.

Lo que se describe a continuación es, entre otras cosas, la demostración de que LY4, un inhibidor selectivo y fuerte de PERK, puede bloquear la metástasis impulsada por HER2 como resultado de su capacidad para causar específicamente la erradicación de las CCD latentes. A partir de esta divulgación, los inhibidores de PERK representan una nueva estrategia para dirigirse a células latentes solitarias durante los estadios de enfermedad residual mínima, ya sea solo o junto con terapias antiproliferativas para ayudar a impedir metástasis letales. A continuación también se describe la demostración de que las proteínas derivadas de la proteína morfogenética ósea pueden inducir latencia en células tumorales diseminadas.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1C muestran que las células HER2⁺ diseminadas inactivas presentan altos niveles de activación de la vía de estrés del RE. La figura 1A muestra imágenes de secciones de pulmón de animales MMTV-HER2 teñidas para detectar HER2, Ki67 (proliferación) y GADD34 (estrés del RE). El gráfico de la figura 1A muestra la cuantificación de células/metástasis positivas para ambos marcadores como porcentaje del total de células. La figura 1B muestra imágenes de metástasis de cáncer de mama humano de diferentes localizaciones (ganglios linfáticos, hígado, pulmón) teñidas para detectar citoqueratinas, Ki67 (proliferación) y GADD34 (estrés del RE). El gráfico de la figura 1B muestra la cuantificación de células/metástasis positivas para ambos marcadores como porcentaje del total de células. La figura 1C muestra la agrupación jerárquica del perfil de expresión génica dirigida de alto rendimiento (columnas) de células individuales (células tumorales diseminadas ("CTD") de pulmón) (filas). Las figuras 2A-2G demuestran que la inhibición de PERK está regulada positivamente en un paciente con células de cáncer HER2⁺. La figura 2A es un diagrama de flujo de las etapas seguidas para el análisis de expresión génica de células individuales con C1 y Biomark HD Fluidigm. Se analizó un total de 255 CCD y 90 células de tumor primario ("TP"). La figura 2B muestra una lista de los genes analizados mediante qPCR de alto rendimiento. La figura 2C es una inmunotransferencia que muestra la inhibición de la fosforilación de PERK por inhibidores de la serie LY (LY2, LY3 y LY4) y GSK2656157 (2 μ M) en células MCF10A-HER2 estresadas colocándolas en suspensión durante 24 horas. Se indican bandas inespecíficas. La figura 2D muestra una curva de viabilidad celular de respuesta a la dosis de LY4 (Cell Titer Blue, CTB) en células MCF10A-HER2, en ausencia (-) o en presencia de estrés (dosis bajas de taspargina, Tg 2 nM) después de 48 horas. La línea discontinua indica el valor de CI_{50} ($\approx$ 9 nM). La figura 2E muestra la selectividad cinasa de los inhibidores de PERK, LY4, LY2, LY3 y GSK2656157, evaluada mediante ensayo bioquímico enzimático. La figura 2F muestra el efecto de LY4 sobre las células de médula ósea totales (en dos miembros inferiores) en mujeres MMTV-HER2 tratadas durante 2 semanas. La figura 2G muestra el efecto de LY4 sobre los glóbulos blancos totales en hembras MMTV-HER2 tratadas durante 2 semanas.

Las figuras 3A-3G muestran que la inhibición de LY4 PERK disminuye la enfermedad metastásica en los pulmones y la médula ósea a nivel de células tumorales diseminadas individuales. La figura 3A es una inmunotransferencia que muestra la inhibición de la fosforilación de PERK (T980) por el inhibidor de PERK, LY4 (2 μ M), en células MCF10A-HER2 privadas de suero durante la noche y tratadas con EGF (100 ng/ml) durante 15 min. En la figura 3B, a hembras MMTV-HER2⁺ (de 24 semanas de vida) se las inyectó diariamente vehículo o LY4 (50 mpk) durante 2 semanas. Se muestra la inmunohistoquímica ("IHQ") de secciones de páncreas y glándula mamaria con anticuerpos contra P-PERK y P-EIF2 α . Los recuadros muestran mayores aumentos. Barra de escala, 100 μ m. La figura 3C muestra una imagen y cuantificación (gráfico de la derecha) de macro-metástasis (>100 células) detectadas mediante tinción con H&E y cuantificadas en 5 secciones de pulmón/animal (n=16). Barra de escala, 100 μ m. El valor de *p* se calculó con el ensayo de Mann-Whitney. La figura 3D muestra una imagen y cuantificación (gráfico de la derecha) de micro-metástasis (2-100 células) detectadas mediante tinción IHQ utilizando un anticuerpo anti-HER2 y cuantificadas por sección de pulmón/animal $\pm$ d.e. (n = 6). Barra de escala, 25 μ m. El valor de *p* se calculó con el ensayo de Mann-Whitney. La figura 3E muestra una imagen y cuantificación (gráfico de la derecha) de células tumorales diseminadas (CTD) solitarias detectadas mediante tinción IHQ para detectar HER2,

clasificado como P-Rb⁺ o P-Rb⁻ y cuantificado por sección de pulmón $\pm$ d.e. (n = 6). Barra de escala, 25 μ m. El valor de *p* se calculó con el ensayo de Mann-Whitney. La flecha y el círculo de la imagen indican una CTD solitaria. La figura 3F muestra una imagen y cuantificación (gráfico de la derecha) de células tumorales diseminadas en médula ósea detectadas mediante tinción IF para CK8/18 y HER2 en cytopines de tejido de médula ósea sin células hematopoyéticas maduras (n=8). Barra de escala, 25 μ m. El valor de *p* se calculó con el ensayo de Mann-Whitney. Las flechas indican células Her2⁺. La figura 3G muestra imágenes representativas de células ZR75.1 HER2⁺ diseñadas para expresar proteínas H2B etiquetadas con Dendra sembradas en Matrigel a baja densidad (células individuales). El día 0, la etiqueta Dendra (fluorescencia verde) se fotoconvirtió con un pulso de luz ultravioleta individual en fluorescencia roja y se utilizó como indicación de inactividad. Los pocillos se trataron desde el día 2 al día 8 con vehículo (DMSO) o LY4 (2 μ M). Los gráficos muestran el porcentaje de células vivas medido el día 8 $\pm$ d.e. (n=4). El valor de *p* se calculó mediante la prueba de la *t* de Student.

Las figuras 4A-4F muestran el efecto del tratamiento con LY4 sobre la metástasis y las células tumorales circulantes ("CTC"). La figura 4A muestra el área normalizada de macro-metástasis individuales animales tratados con vehículo y LY4 (n = 21 y 15). El valor de *p* se calculó con el ensayo de Mann-Whitney. La figura 4B es un gráfico que muestra la cuantificación de células tumorales circulantes/ml de sangre mediante tinción de cytopines con HER2. La figura 4C muestra una imagen y un gráfico que muestra el porcentaje de micro-metástasis P-Rb⁺ por sección de pulmón/animal (n=4 y 6). La figura 4D es una imagen que muestra una fotoconversión del 100 % en ZR75.1-H2B-Dendra de fluorescencia verde a fluorescencia roja el día 0, después de sembrar en 3D Matrigel. En la figura 4E, se sembraron células fotoconvertidas ZR75.1-H2B-Dendra a densidad baja (células individuales) o alta. El gráfico muestra el porcentaje de retención de la etiqueta roja en células sembradas como células individuales o a alta densidad $\pm$ d.e. (n=4). El valor de *p* se calculó mediante la prueba de la *t* de Student. La figura 4F es como la 4D, pero las células sembradas a alta densidad se trataron desde el día 2 al día 8 con vehículo (DMSO) o LY4 (2 μ M). El gráfico muestra el porcentaje de colonias vivas medido el día 8 $\pm$ d.e. (n=4). El valor de *p* se calculó mediante la prueba de la *t* de Student.

Las figuras 5A-5C demuestran que la inhibición de PERK está regulada positivamente en células Her2⁺. La figura 5A muestra que PERK (EIF2AK3) está regulado positivamente en una subpoblación de pacientes con cáncer de mama HER2⁺. El análisis de los datos de cáncer de mama TCGA de los casos HER2⁺ (58 tumores) se realizó utilizando cBioPortal. La figura 5B muestra imágenes representativas de tinción con carmín de una preparación microscópica completa de glándula mamaria de ratones FVB normales en comparación con una preparación microscópica completa de glándula mamaria de ratones MMTV-neu tratados con vehículo y LY4. La figura 5C muestra la cuantificación de estructuras histológicas (desde conducto vacío normal hasta neoplasia intraepitelial mamaria de tipo CDIS), en las imágenes de la parte superior y a mayor aumento en la fila inferior) presentes en secciones de glándula mamaria teñidas con H&E.

Las figuras 6A-6C muestran que el inhibidor de PERK, LY4, produce la "normalización" de la glándula mamaria en el modelo de cáncer de mama MMTV-HER2⁺. La figura 6A muestra imágenes representativas de tinción con carmín de una preparación microscópica completa de glándula mamaria y de secciones de glándula mamaria teñidas con H&E de animales tratados con vehículo y LY4. Barra de escala, 100 μ m. La figura 6B muestra la cuantificación de estructuras histológicas (conducto vacío c.v., conducto ocluido c.o., hiperplasia ocluida h.o. y neoplasia intraepitelial mamaria N.I.M. de tipo CDIS) presentes en secciones de glándula mamaria teñidas con H&E (n=50/animal, animales n=13) que se encuentran en animales tratados con vehículo y LY4 $\pm$ d.e.m. Significación estadística, el valor de (*p*) se calculó con el ensayo de Mann-Whitney. La figura 6C muestra IHQ para el marcador luminal epitelial citoqueratina 8/18 (CK8/18) y el marcador mioepitelial actina del músculo liso ("AML") en secciones de glándula mamaria. El gráfico muestra la puntuación de las estructuras CK8/18⁺ y AML⁺ por animal, n=12. El valor de *p* se calculó con el ensayo de Mann-Whitney. Barra de escala, 75 μ m.

Las figuras 7A-7F muestran el efecto del tratamiento con LY4 sobre los niveles de P-PERK, de P-histona H3 y el tamaño del tumor. La figura 7A es una transferencia Western para niveles de P-PERK en lisados tumorales MMTV-neu de animales tratados con vehículo y LY4. La figura 7B muestra los volúmenes (mm³) de tumores de hembras tratadas con vehículo (parte superior) y con LY4 (parte inferior). Cada línea representa un tumor. La figura 7C muestra la disminución porcentual en el tamaño del tumor en hembras tratadas con LY4 que mostraron reducción del tumor. Cada línea representa un tumor y un animal. La figura 7D muestra IHQ para P-histona H3 en secciones de tumores de glándula mamaria, imágenes representativas y cuantificación (gráfico de la derecha). El valor de *p* se calculó con el ensayo de Mann-Whitney. En la figura 7E, se sembraron en matrigel células ZR75.1 que sobreexpresaban HER2 y después del establecimiento del ácino (día 10), los pocillos se trataron con vehículo (control) o con LY4 (2 μ M) durante 10 días. El gráfico muestra el porcentaje de células positivas a caspasa-3 escindida por ácidos (n=20) $\pm$ d.e. El valor de *p* se calculó mediante la prueba de la *t* de Student. En la figura 7F, células MCF10A-HER2 se sembraron en Matrigel y después del establecimiento de los ácidos (día 4), los pocillos se trataron con vehículo (control) o LY4 (2 μ M) durante 10 días. El gráfico muestra el porcentaje de células positivas a P-histona H3 por ácidos (n=20) $\pm$ d.e. El valor de *p* se calculó mediante la prueba de la *t* de Student.

Las figuras 8A-8D muestran que la inhibición de PERK afecta al crecimiento tumoral en hembras MMTV-HER2⁺. En la figura 8A, a hembras MMTV-neu (de 24 a 32 semanas de vida) que presentaban tumores ostensibles se las inyectó diariamente vehículo o LY4 (50 mpk) durante 2 semanas. El gráfico muestra la variación porcentual del tamaño del tumor en animales tratados con vehículo y LY4 $\pm$ d.e. (n=16). El valor de *p* se calculó con el ensayo de Mann-Whitney. La figura 8B es un gráfico que muestra el volumen final del tumor (mm³). Los bigotes representan el mínimo y el máximo de los datos (n=16). El valor de *p* se calculó con el ensayo de Mann-Whitney. La figura 8C muestra IHQ representativa de la tinción TUNEL para medir los niveles de apoptosis en secciones de tumores. Barra de escala, 10 y 50 μ m. Gráfico, porcentaje de células TUNEL positivas en secciones de tumores tratadas

con vehículo y LY4 (n=5). El valor de p se calculó con el ensayo de Mann-Whitney. En la figura 8D, células MCF10A-HER2 or SKBR3 HER2⁺ se sembraron en Matrigel y después del establecimiento de los ácinos (día 4), los pocillos se trataron con vehículo (control) o con LY4 (2 μ M) durante 10 días. El gráfico muestra el porcentaje de células positivas a caspasa-3 escindida por ácinos (n=20) $\pm$ d.e. El valor de p se calculó mediante la prueba de la t de Student. Imágenes confocales representativas de ácinos de MCF10A-HER2 teñidos para caspasa-3 escindida.

Las figuras 9A-9F muestran que el tratamiento con LY4 disminuye los niveles de fosfo-HER2 y las vías de señalización posteriores. La figura 9A muestra imágenes representativas de IHQ para P-HER2, P-PERK y P-EIF2 α en una sección de tumor de mama MMTV-HER2. Cada apreciar que, el borde positivo para P-HER2 se superpone con las tinciones de P-PERK y P-EIF2 α . Barra de escala, 100 μ m. La figura 9B muestra la agrupación jerárquica del perfil de expresión génica dirigida de alto rendimiento (columnas) de células individuales (tumor de mama primario) (filas) de hembras MMTV-HER2. La figura 9C muestra tinción IHQ de P-HER2 representativa y HER2 total en tumores de mama tratados con vehículo y con LY4. El gráfico muestra la puntuación de P-HER2 en tumores tratados con vehículo y con LY. Cuantificación de los niveles de P-HER2 en secciones de tumores, mediante intensidad IHQ y puntuación de área (n=11) (véase la figura 10A). Barra de escala, 50 μ m. El valor de p se calculó con el ensayo de Mann-Whitney. En la figura 9D, células MCF10A-HER2 se privaron de suero durante la noche y se trataron con +/-LY4 (2 μ M), después de lo cual se añadió +/-EGF (100 ng/ml) durante 15 minutos antes de recogerse. Los niveles de P-HER2, P-EGFR, P-AKT, P-S6 y P-ERK, así como el total de HER2 y EGFR se evaluaron mediante transferencia Western. Se utilizaron GAPDH y β -TUB como controles de carga. Se muestra una transferencia representativa de tres. Análisis de densitometría de P-HER2 (n=3) $\pm$ d.e. El valor de p se calculó mediante la prueba de la t de Student. En la figura 9E, las células MCF10A-HER2 se trataron como en la figura 9D y se realizó un ensayo de biotilación del receptor de superficie. Se evaluaron los niveles de HER2 y P-HER2 totales en la superficie. Se muestra la densitometría para P-HER2. En la figura 9F, se trataron células MCF10A-HER2 como en la figura 9D y se realizó un ensayo de biotilación del receptor de superficie reversible. Se evaluaron los niveles de endocitosis de HER2 y P-HER2 totales. Se muestra uno de los dos experimentos.

Las figuras 10A-10C muestran la cuantificación de los niveles de P-HER2 en células MCF10A-HER2. La figura 10A muestra el sistema de puntuación utilizado para la cuantificación de los niveles de P-HER2 en secciones de tumores de glándula mamaria. El área de IHQ P-HER2 positiva se multiplicó por su puntuación de intensidad según la puntuación establecida que se muestra en estas imágenes representativas. Barra de escala, 100 μ m. En la figura 10B, células MCF10A-HER2 se privaron de suero durante la noche y se trataron con +/-LY4 (2 μ M), después de lo cual se añadió +/-EGF (100 ng/ml) durante 20 minutos antes de recogerse. Los niveles de P-HER2/Y1112 y P-HER2/Y877 se evaluaron mediante transferencia Western. Se utilizaron GAPDH y HSP90 como controles de carga. La figura 10C muestra la entrada de los extractos usados en el ensayo de biotilación de superficie.

Las figuras 11A-11E muestran que la inhibición secuencial de CDK4/6 seguida de la inhibición de PERK mejora el efecto anti-metastático de LY4. La figura 11A es una ilustración esquemática de un experimento *in vivo* diseñado para evaluar el tratamiento secuencial de Abemaciclib y LY4 en un modelo de ratón MMTV-neu/HER2⁺. Durante 4 semanas, ratones hembra MMTV-neu/HER2⁺ (de 24 semanas de vida) se trataron diariamente con el inhibidor de CDK4/6, Abemaciclib (50 mpk), seguido de +/- LY4 (50 mpk). La figura 11B es una serie de IHQ fluorescente de secciones de tumores para HER2, Ki67 (proliferación) y GADD34 (estrés del RE). Barra de escala, 100 μ m. Las flechas indican alta fluorescencia. La figura 11C es un gráfico que muestra el número de macro-metástasis (>100 células) detectadas mediante tinción con H&E y cuantificadas en 5 secciones de pulmón/animal (n=8). El valor de p se calculó con el ensayo de Mann-Whitney. La figura 11D es un gráfico que muestra el número de micro-metástasis (2-100 células) detectadas mediante tinción IHQ usando un anticuerpo anti-HER2 y cuantificadas por sección de pulmón/animal $\pm$ d.e. (n=8). El valor de p se calculó mediante la prueba de Mann-Whitney. La figura 11E es un gráfico que muestra el número de células tumorales diseminadas solitarias detectadas mediante tinción IHQ para HER2, clasificadas como Ki67⁺ o Ki67⁻ y cuantificadas por sección de pulmón $\pm$ d.e. (n=8). El valor de p se calculó mediante la prueba de Mann-Whitney.

Las figuras 12A-12G muestran terapias mono o combinadas propuestas que incluyen el uso de LY4 y experimentos que muestran que el tratamiento de células de melanoma con el inhibidor de CDK4/6 Abemaciclib junto con LY4 afecta diferencialmente a la viabilidad celular *in vitro* en cultivo 2D y 3D. La figura 12A es una ilustración esquemática del razonamiento de la combinación de Abemaciclib y LY4. La figura 12B es un gráfico de barras que muestra los resultados de un tratamiento *in vitro* de células de melanoma con mutación Braf (WM35) con Abemaciclib 0 nM, 10 nM o 50 nM durante 1 semana seguido de un tratamiento de 48 horas con LY4 2 μ M. La figura 12C incluye imágenes de células teñidas con DAPI después del tratamiento previo con Abemaciclib durante 1 semana, seguido de tratamiento con LY4 2 μ M. Se sembraron 5.000 células en matrigel. En las figuras 12D-12E, células de melanoma WM35 se trataron previamente con Abemaciclib durante 5 semanas, seguido de tratamiento con LY4 en medio completo y Abemaciclib. Las células se tiñeron con azul tripano para identificar células viables. La figura 12D es un gráfico que muestra células sensibles a Abemaciclib. La figura 12E es un gráfico que muestra células resistentes a Abemaciclib. La figura 12F muestra imágenes de células teñidas con DAPI después del tratamiento previo con Abemaciclib durante 5 semanas y el tratamiento conjunto con Abemaciclib y LY4 2 μ M. Se sembraron 1.000 células en matrigel. La figura 12G sugiere que cuando se induce la detención del crecimiento con Abemaciclib, las células regulan positivamente una diana PERK (GADD34), lo que puede explicar por qué las células son sensibles a LY4. Las células de melanoma WM35 no tratadas previamente o resistentes (R) a Abemaciclib, se trataron en cultivo con vehículo (-) con o Abemaciclib 150 y 300 nM durante 24 horas. Después, las células se sometieron a lisis y se exploraron mediante transferencia Western para determinar la expresión de GADD34. La expresión de tubulina se utilizó como control de carga. Cada apreciar que en las células no tratadas

previamente con Abemaciclib, GADD34 está regulado positivamente, lo que sugiere la activación de PERK. Las células resistentes parecen mostrar niveles más altos de GADD34 que no cambian ni disminuyen después del tratamiento adicional con Abemaciclib.

Las figuras 13A-13C demuestran el efecto de BMP7-F9 sobre la proporción de actividad ERK/p38 y de varios ARNm asociados a genes con firma distintiva de latencia. La figura 13A muestra que el tratamiento con BMP7-F9 a 2 ng/ml, 5 ng/ml y 10 ng/ml (segunda, tercera y cuarta barras grises, respectivamente: el control es la primera barra negra) reduce la proporción de actividad ERK/p38 sobre el control, determinada mediante transferencia Western en células HEp3 HNSCC. El efecto sobre la proporción de actividad ERK/p38 se observa después de 2-6 y 24 horas (del segundo al cuarto grupo de columnas). En los 30 primeros minutos, la actividad de ERK es estimulada por BMP7 (primer conjunto de columnas). La figura 13B muestra que el tratamiento con BMP7-F9 induce los ARNm de DEC2, p53 y p27 (BMP7-F9 10 ng/ml, 24 horas), que codifican genes con firma distintiva de latencia. La figura 13C muestra que el tratamiento con BMP7-F9 de las mismas células induce la acumulación nuclear de NR2F1, un fuerte factor de transcripción inductor de latencia, determinada mediante inmunofluorescencia (10 ng/ml, 24 horas). Las flechas indican la fluorescencia de NR2F1. Diferencias en la FIG. 13A y FIG. 13B, el valor de $p < 0,05$ se calculó mediante la prueba de la t de Student. Estos datos confirman la hipótesis de que BMP7-F9 es un fuerte inductor de genes de latencia que se encuentran regulados positivamente en las CCD latentes espontáneamente o los que están inducidos mediante reprogramación o señalización de TGF β 2 en la médula ósea.

Las figuras 14A-14E muestran cómo BMP7-F9 induce la detención del crecimiento de las células T-HEp3 *in vitro* e *in vivo*. La figura 14A muestra que el tratamiento con BMP7-F9 de células T-HEp3 inhibe su proliferación *in vitro* durante 48 horas, determinada mediante ensayo con cell titer blue (UFR, unidades de fluorescencia relativa). La figura 14B es una ilustración esquemática del procedimiento experimental *in vivo* utilizado en las figuras 14C-14D. Células T-HEp3 se trataron previamente durante 24 horas con BMP7-F9 *in vitro* y después se inocularon en membranas corioalantoideas ("MCA") de embriones de pollo (figura 14C), donde se trataron diariamente *in vivo* con vehículo o BMP7-F9 (50 ng/ml) antes de recoger los tumores y se cuantificó el número de células HEp3 HNSCC (figura 14D) y los niveles de P-H3 (figura 14E). En la figura 14E, las flechas indican solapamiento de fluorescencia de P-H3 y DAPI. Estos datos confirman la hipótesis de que los marcadores de latencia identificados en la figura 13B, en el sistema de MCA, se correlacionan con la supresión del crecimiento *in vitro* e *in vivo* en un experimento de corta duración.

Las figuras 15A-15C muestran la evaluación del tratamiento con BMP7-F9 en un modelo de enfermedad en ratón. La figura 15A es una ilustración esquemática de un procedimiento experimental *in vivo* utilizado para evaluar el efecto de BMP7-F9 sobre el inicio de la metástasis. Tumores HEp3-GFP HNSCC crecieron hasta que midieron aproximadamente 300 mm³ y después se trataron en el entorno neoadyuvante con 50 μ g/kg de BMP7-F9 hasta que los tumores midieron aproximadamente 600 mm³. A continuación, los tumores se extirparon con cirugía. 1-2 días después de la cirugía, el tratamiento adyuvante con BMP7-F9 prosiguió durante otras 3, 4 o 6 semanas. Después, se sacrificó a los animales y con un microscopio de fluorescencia se puntuó la carga de CCD en los pulmones. La figura 15B muestra que, después de la cirugía tumoral, BMP7 limita el desarrollo de recidivas locales y distantes. Siguiendo el protocolo de la figura 15A, durante 3 y 6 semanas, se trataron ratones NSG. En esos puntos temporales, se puntuó el porcentaje de recidiva local y la incidencia de las CCD. En la figura 15C, los ratones se trataron como en la figura 15A, excepto que el tratamiento adyuvante fue durante 4 semanas. El número de células GFP positivas en pulmones disociados se puntuó después del tratamiento. Esta es una medida de la carga de CCD en los pulmones, que disminuye significativamente con el tratamiento de BMP7-F9. Cada apreciar que la mediana de la carga de CCD desciende un log y que la BMP-7 cura aparentemente de CCD a 3 de 7 animales.

Descripción detallada

En el presente documento se desvelan métodos de tratamiento de cáncer residual mínimo en un sujeto. Un aspecto de la divulgación se refiere a un método de tratamiento de cáncer residual mínimo en un sujeto. Este método implica poner en contacto células cancerosas diseminadas (CCD) de un sujeto con una proteína derivada de la proteína morfogenética ósea 7 (BMP7). La puesta en contacto de células cancerosas diseminadas (CCD) de un sujeto con una proteína derivada de la proteína morfogenética ósea 7 (BMP7) induce o mantiene la latencia en las CCD del sujeto que se han puesto en contacto para tratar un cáncer residual mínimo en el sujeto.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cáncer residual mínimo" incluye una situación o condición en la que, mediante criterios radiográficos e histológicos estándar, no hay pruebas de cáncer en un sujeto, pero donde el sujeto en realidad tiene células cancerosas residuales (es decir, CCD) en la sangre (tales como CTC) o en la médula ósea o en los ganglios linfáticos (tales como CTD). Puede producirse un cáncer residual mínimo después del tratamiento del cáncer con quimioterapia, cirugía y/o radioterapia. Los métodos de detección radiográfica e histológica estándar pueden incluir, por ejemplo, pruebas de obtención de imágenes (rayos X, ultrasonido, RM); pruebas de sangre o inmunoquímicas para marcadores tumorales o marcadores tumorales circulantes conocidos, tales como el PSA; análisis de biopsias o muestras citológicas para evaluar marcadores tumorales conocidos, por ejemplo, el número de células tumorales presentes o la relativa escasez de dichas células.

Es bien conocido en la técnica que las células tumorales pueden diseminarse tempranamente desde tumores primarios como CTC y CTD. De hecho, después de una cirugía tumoral, se han identificado CTD en sujetos sin evidencia de

enfermedad. En casos poco frecuentes en los que los antecedentes de cáncer no han descartado la donación de trasplante, los receptores han desarrollado metástasis derivadas del donante aunque éste haya estado durante hasta 30 años sin la enfermedad (MacKie et al., "Fatal Melanoma Transferred in a Donated Kidney 16 Years after Melanoma Surgery", *N. Engl. J. Med.* 348:567-568 (2003)).

La filogenética tumoral y la secuenciación del genoma completo de las metástasis en pacientes individuales han sugerido la transmisión de tumor primario a metástasis y de metástasis a metástasis, que demuestra que un modelo de crecimiento continuo/lineal no tiene en cuenta las recidivas tardías (de más de 10 años) en pacientes individuales (Gundem et al., "The Evolutionary History of Lethal Metastatic Prostate Cancer", *Nature* 520:353-357 (2015) y Naxerova et al., "Using Tumour Phylogenetics to Identify the Roots of Metastasis in Humans", *Nature Reviews Clinical Oncology* 12:258-272 (2015)).

El análisis de CTC de células individuales también ha demostrado una relación de linaje genético entre las CTC y los tumores primarios (Ni et al., "Reproducible Copy Number Variation Patterns Among Single Circulating Tumor Cells of Lung Cancer Patients", *PNAS* 110(52):21083-88; Heitzer et al., "Complex Tumor Genomes Inferred from Single Circulating Tumor Cells by Array-CGH and Next-Generation Sequencing", *Cancer Res.* 73:2965-75 (2013); y Lohr et al., "Whole-Exome Sequencing of Circulating Tumor Cells Provides a Window into Metastatic Prostate Cancer", *Nature Biotech.* 32:479-484 (2014)).

Asimismo, en los seres humanos, las CTC/CTD no se correlacionan con el estadio ni con el tamaño del cáncer primario (Krishnamurthy et al., "Detection of Minimal Residual Disease in Blood and Bone Marrow in Early Stage Breast Cancer", *Cancer* 116(14):3330-3337 (2010)). En cambio, se cree que las CTC y las CTD conservan la capacidad de formar metástasis/enfermedad recidivante. En particular, se ha demostrado que la detección de las CTC y de las CTD es indicativa de metástasis y recidiva en cánceres de mama y próstata (Braun et al., "A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer", *NEJM* 353:793-802 (2005); Hayes et al., "Circulating Tumor Cells at Each Follow-up Time Point During Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict Progression-Free and Overall Survival", *Clin. Cancer Res.* 12(14):4218-4224 (2006); y de Bono et al., "Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer", *Clin. Cancer Res.* 14:6302-6309 (2008)).

Se cree que las metástasis surgen de CCD proliferativas, aunque también de latentes que han experimentado una reactivación. Dado que los pacientes pueden desarrollar metástasis años después de la resección del tumor, se cree que las CCD latentes pueden representar la principal entidad responsable de la recidiva tardía de los cánceres. Como se usa en el presente documento, el término "latencia" se refiere a una detención mitótica y de crecimiento temporal, definido como latencia celular, donde mecanismos intrínsecos y/o extrínsecos impulsan a grupos pequeños o solitarios de CCD a entrar en inactividad (una detención reversible del crecimiento). Una segunda categoría de lesiones latentes se define por la latencia angiogénica, donde la masa tumoral se mantiene constante mediante un equilibrio entre células en división y células que mueren debido a una vascularización deficiente. Una tercera categoría es la latencia mediada por el sistema inmunitario, donde dicho sistema mantiene constante una masa tumoral en proliferación a través de una actividad citotóxica persistente que esquilma persistentemente la población de células cancerosas en crecimiento (véase, p. ej., Sosa et al., "Mechanisms of Disseminated Cancer Cell Dormancy: An Awakening Field", *Nat. Rev. Cancer* 14(9):611-622 (2014)). Las células latentes pueden surgir de tumores primarios establecidos, tumores secundarios y/o lesiones preinvasivas.

En una realización de los métodos desvelados en el presente documento, las CCD son células cancerosas latentes, lo que significa que las células cancerosas experimentan una detención mitótica/de crecimiento temporal o un comportamiento similar a la senescencia.

Las CCD pueden detectarse en aspirados de médula ósea realizando una selección negativa que elimine las células de linaje hematopoyético y después realizando una tinción positiva para EpCAM o CK8/18. En combinación, las células se pueden teñir con marcadores de latencia para determinar si se encuentran en un estado proliferativo o latente. Esto último se puede realizar después de la fijación. Para realizar un análisis del genoma completo o del transcriptoma completo, CCD positivas para EpCAM se aíslan vivas de la médula ósea y se procesan con respecto al análisis del genoma o del transcriptoma completo (Gužvić et al., "Combined Genome and Transcriptome Analysis of Single Disseminated Cancer Cells from Bone Marrow of Prostate Cancer Patients Reveals Unexpected Transcriptomes", *Cancer Res.* 74(24):7383-94 (2014)).

Los métodos descritos en el presente documento pueden implicar además detectar la presencia de las CCD en el sujeto antes de dicha puesta en contacto. Como se muestra en la Tabla 1 a continuación, se pueden identificar CCD latentes, ya que se distinguen fenotípicamente de otros tipos de células (Sosa et al., "Mechanisms of Disseminated Cancer Cell Dormancy: An Awakening Field", *Nat. Rev. Cancer* 14(9):611-622 (2014)).

Tabla 1. Marcadores de CCD

Cáncer	Fenotipo CCD latente	Fenotipo CCD activo
Mama	TGFβR3 ↑	P-FAKf
	BMPR2 ↑	EDG2 ↑
	P-ERK ↓	P-Src ↑
	P-p38 ↑	P-ERK ↑
	GRP78 ↑	P-p38 ↓
	POSTN ↓	NR2F1 ↓
	Receptores de TSP ↑	
	NR2F1 ↑	
Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC, <i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>)	TGFβR3 ↑	P-FAK ↑
	BMPR2 ↑	P-Src ↑
	P-ERK ↓	P-ERK ↑
	P-p38 ↑	P-p38 ↓
	GRP78 T	NR2F1 ↓
	NR2F1 ↑	
Próstata	TGFβR3 ↑	P-FAK ↑
	BMPR2 ↑	P-Src ↑
	P-ERK ↓	P-ERK ↑
	P-p38 ↑	P-p38 ↓
	GRP78 ↑	NR2F1 ↓
	NR2F1 ↑	
Glioblastoma, osteosarcoma y liposarcoma	POSTN ↓	No determinado
	Receptores de TSP ↑	
Ovárico	ARHI ↑	No determinado
	genes ATG ↑	
Pancreático	IFNR ↑	No determinado
	TNFR ↑	

Se han identificado CTD en la médula ósea del 13 al 72 % de los pacientes con cáncer de próstata antes de la cirugía y del 20 al 57 % de los pacientes sin pruebas de enfermedad más de 5 años después de la cirugía (Morgan et al., "Disseminated Tumor Cells in Prostate Cancer Patients after Radical Prostatectomy and without Evidence of Disease Predicts Biochemical Recurrence", Clin. Cancer Res. 15:677-683 (2009) y Weckermann et al., "Perioperative Activation of Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow of Patients with Prostate Cancer", J. Clin. Oncol. 27(10):1549-56 (2009)). La detección de las CDT es un pronóstico de recidiva en pacientes con latencia clínica.

- 10 Como se usa en el presente documento, la expresión "latencia clínica" se refiere al tiempo prolongado sin enfermedad clínica (p. ej., de más de 5 años) entre la extirpación de un tumor primario y la recidiva de la enfermedad. La latencia clínica es común en el cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer renal, cáncer de tiroides, linfoma de células B y melanoma (Lam et al., "The Role of the Microenvironment - Dormant Prostate Disseminate Tumor Cells in the Bone Marrow", Drug Discov. Today Technol. 11:41-47 (2014); Gelao et al., "Tumour Dormancy and Clinical Implications in Breast Cancer", Ecancermedicalscience 7:320 (2013); Ellis et al., "Detection and Isolation of Prostate Cancer Cells from Peripheral Blood and Bone Marrow", Urology 61:277-281 (2003); Morgan et al., "Disseminated Tumor Cells in Prostate Cancer Patients after Radical Prostatectomy and without Evidence of Disease Predicts Biochemical Recurrence", Clin. Cancer Res. 15:677-683 (2009); y Pfitzenmaier et al., "Telomerase Activity in Disseminated Prostate Cancer Cells", BJU Int. 97:1309-1313 (2006)), y reside en órganos distantes, incluidos huesos, ganglios linfáticos, hígado y pulmón, donde pueden permanecer latentes durante un período de tiempo prolongado

(p.ej., más de 10 años) hasta que, en algunos pacientes, pueden desarrollarse metástasis clínicas.

En algunas realizaciones de llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento, al sujeto se le diagnosticado tener CTC.

5 En algunas realizaciones de llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento, al sujeto se le ha diagnosticado tener CTD y/o un cáncer no metastásico.

10 Como se usa en el presente documento, un "sujeto" es, p. ej., un paciente, tal como un paciente con cáncer, e incluye cualquier animal, pero preferentemente un mamífero. En una realización, el sujeto es un sujeto humano. Los sujetos humanos adecuados incluyen, sin limitación, niños, adultos y sujetos de edad avanzada a quienes se les ha diagnosticado tener células cancerosas diseminadas y/o un cáncer no metastásico.

15 En otras realizaciones, el sujeto puede ser un animal bovino, ovino, porcino, felino, equino, murino, canino, un conejo, etc.

20 Al llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento, las CCD de un sujeto se ponen en contacto para inducir o mantener la latencia de las CCD. Esto significa el establecimiento de un estado no proliferativo sostenido en una CCD o la continuación de un estado no proliferativo en una CCD.

25 En una realización, el cáncer residual mínimo se trata en un sujeto al que se le ha diagnosticado cáncer. Por ejemplo, y sin limitación, al sujeto se le ha diagnosticado uno o más de cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, linfoma de células del manto, leucemia, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, melanoma uveal y cutáneo, cánceres de piel, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma, neuroblastoma y cáncer colorrectal.

Otros cánceres también pueden ser susceptibles de tratamiento con los métodos descritos en el presente documento.

30 En una realización, se trata un cáncer residual mínimo relacionado con, o asociado a, cáncer de mama de un sujeto. El cáncer de mama puede seleccionarse de uno o más de cáncer de mama invasivo, carcinoma ductal *in situ* (CDIS), carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS) y cáncer de mama inflamatorio.

35 Para categorizar molecularmente los cánceres de mama, pueden utilizarse diversos factores moleculares, incluidos los receptores de hormonas y el estado del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Los grupos HER2 y de tipo basal son los principales subtipos moleculares identificados entre los cánceres de mama con receptores hormonales negativos (Schnitt, "Classification and Prognosis of Invasive Breast Cancer: From Morphology to Molecular Taxonomy", Modern Pathology 23: S60-S64 (2010)). En una realización, el cáncer de mama es cáncer de mama HER2⁺.

40 En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, el sujeto se ha sometido a resección quirúrgica para extirpar un tumor. Por ejemplo, el sujeto puede haberse sometido a uno o más de una mastectomía, prostatectomía, eliminación de lesiones cutáneas, resección del intestino delgado, gastrectomía, toracotomía, adrenalectomía, apendectomía, colectomía, ooforectomía, tiroidectomía, histerectomía, glosectomía, polipectomía de colon y resección colorrectal.

45 De otro modo, en el presente documento se desvelan métodos en los que las células cancerosas diseminadas (CCD) de un sujeto se ponen en contacto con una proteína derivada de la proteína morfogenética ósea 7 (BMP7). BMP7 es un miembro de la superfamilia de TGFβ, que es secretado por los osteoblastos del estroma de la médula ósea y puede influir en el microambiente de CCD/CTD. BMP7 desempeña un papel clave en la transformación de células mesenquimatosas en hueso y cartílago y se ha demostrado que induce de forma reversible la senescencia en células madre de tipo cáncer de próstata (Kobayashi et al., "Bone Morphogenetic Protein 7 in Dormancy and Metastasis of Prostate Cancer Stem-Like Cells in Bone", J. Exp. Med. 208(13):2641-55 (2011)). Pro-BMP7 es un producto intermedio entre la pre-BMP7 y la BMP7 madura que se genera mediante el procesamiento proteolítico de la preproteína, que genera subunidades del homodímero maduro.

55 La proteína BMP7 humana es una molécula de señalización secretada de la superfamilia TGF-beta y originalmente se identificó por su capacidad para inducir la formación de hueso, pero después se reconoció como una citocina multifuncional que actúa como mediadora en el crecimiento y la diferenciación de muchos tipos de células diferentes. La proteína BMP7 humana se expresa en las células como una proteína precursora de 292 aminoácidos y la proteína madura, la BMP7 biológicamente activa, se genera mediante la eliminación proteolítica del péptido señal y el propéptido. La secuencia de aminoácidos de la proteína BMP7 humana de tipo silvestre que contiene el péptido señal (los primeros 29 aminoácidos), prodominio y péptido maduro (**en negrita**) se indica como SEQ ID NO:1, de la siguiente manera:

MHVRSLRAAA PHSFVALWAP LFLRLSALAD FSLDNEVHSS FIHRRLRSQE REMQREILS
 ILGLPHRPRP HLQGHNSAP MFMLDLYNAM AVEEGGGPGG QGFSYPYKAV FSTQGPPPLAS
 LQDSHFLTDA DMVMSFVNLV EHDKEFFHPR YHHREFRFDL SKIPEGEAVT AAEFRIYKDY
 IRERFDNETF RISVYQVLQE HLGRESDLFL LDSRTLWASE EGWLVDITA TSNHWVNP
 HNLGLQLSVE TLDGQSINPK LAGLGRHGP QNKQ**PFMVAF** **FKATEVHFRS** **IRSTGSKQRS**
QNRSKTPKNQ **EALRMANVAE** **NSSSDQRQAC** **KKHELYVSFR** **DLGWQDWIIA** **PEGYAAAYCE**
GECAFPLNSY **MNATNHAIVQ** **TLVHFINPET** **VPKPCCAPTQ** **LN AISVLYFD** **DSSNVILKKY**
RNMVVRACGC H

Un experto en la materia entendería que el péptido señal puede eliminarse mediante escisión proteolítica dando como resultado un prodominio intacto/péptido maduro que se designa como pro-BMP7.

La BMP7 humana madura de tipo silvestre es un dímero de dos proteínas homodiméricas glucosiladas, de 139 aminoácidos, unidas por disulfuro, de aproximadamente 35 kDa. Cada proteína homodimérica tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:2:

STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE
 GYAAAYCEGE CAFPLNSYMN ATNHAIVQTL VHFNPETVP KPCCAPTQLN AISVLYFDDS
 SNVILKKYRN MVVRACGCH

Las variantes de la proteína BMP7 humana incluyen variantes de la BMP7 humana madura de SEQ ID NO:2, con cambios de aminoácidos específicos indicados en la secuencia consenso como se muestra en SEQ ID NO:3:

STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSXQRQCKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPX
 GYAAAYCEGE CAFPLNSYMN ATNHAXXQXL XHXXNPETVP KPCCAPTQLX AISXLYFDDX
 SNVILKKYRN MXVXACGCH

Las variantes particulares de la proteína BMP7 madura humana de la presente divulgación tienen mayor actividad específica, mejores características de solubilidad, mejor biodisponibilidad, unión reducida a inhibidores circulantes endógenos y/o actividad EBF reducida en comparación con la proteína BMP7 humana madura de tipo silvestre.

Las variantes adecuadas de la proteína BMP7 humana se seleccionan del grupo que consiste en F93V/N110G; Y65G/I86L/T89A/N110G; Y65G/I86L/N110G/Y128F; Y65G/I86L/N110G/Y128W; Y65G/I86L/F93V/N110G/Y128W (BMP7-F9); Y65G/T89A/N110G/Y128F; Y65G/I86L/N110G; e Y65G/V114M (véase la Tabla 2 a continuación).

Tabla 2. Variantes ilustrativas de BMP7 humana

Variante de BMP7	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
F93V/N110G	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAAYCEGE CAFPLNSYMN ATNHAIVQTL VHV IN PETVP KPCCAPTQ L G AISVLYFDDS SNVILKKYRN MVVRACGCH	4
Y65G/I86L/ T89A/N110G	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAA G YCEGE CAFPLNSYMN ATNH ALVQ AL VHFNPETVP KPCCAPTQ L G AISVLYFDDS SNVILKKYRN MVVRACGCH	5

(continuación)

Variante de BMP7	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Y65G/I86L/ N110G/Y128F	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAA G YCEGE CAFPLNSYMN ATNH A L V QTL VHF I NPETVP KPCCAPT Q L G AISVLYFDDS SNVILKK F RN MVVRACGCH	6
Y65G/I86L/ N110G/Y128W	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAA G YCEGE CAFPLNSYMN ATNH A L V QTL VHF I NPETVP KPCCAPT Q L G AISVLYFDDS SNVILKK W RN MVVRACGCH	7
Y65G/I86L/ F93V/N110G/	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAA G YCEGE CAFPLNSYMN	8
Y128W (BMP7-F9)	ATNH A L V QTL VHF I NPETVP KPCCAPT Q L G AISVLYFDDS SNVILKK W RN MVVRACGCH	
Y65G/T89A/ N110G/Y128F	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAA G YCEGE CAFPLNSYMN ATNH A I V Q A L VHF I NPETVP KPCCAPT Q L G AISVLYFDDS SNVILKK F RN MVVRACGCH	9
Y65G/I86L/ N110G	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAA G YCEGE CAFPLNSYMN ATNH A L V QTL VHF I NPETVP KPCCAPT Q L G AISVLYFDDS SNVILKKYRN MVVRACGCH	10
Y65 G/ V 114M	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAA G YCEGE CAFPLNSYMN ATNH A I V QTL VHF I NPETVP KPCCAPT Q L N AIS M LYFDDS SNVILKKYRN MVVRACGCH	11

En un caso, las variantes de BMP7 se seleccionan del grupo que consiste en Y65G/I86L/N110G/Y128W e Y65G/I86L/F93V/N110G/Y128W.

5

En un caso, la proteína derivada de BMP7 es una variante de BMP7 diseñada de pro-BMP7. La variante diseñada de pro-BMP7 puede comprender sustituciones de aminoácidos en posiciones de aminoácidos correspondientes al dominio de la proteína madura BMP7. La variante diseñada de pro-BMP7 puede procesarse a una proteína derivada de BMP7 madura. Las variantes adecuadas de pro-BMP7 que contienen el prodominio fusionado al extremo N de la variante de la proteína BMP7 madura humana se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, tal como se ilustra en la Tabla 3.

10

Tabla 3. Variantes ilustrativas de Pro-BMP7 humana

Variante de Pro-BMP7	Secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO: 12	DFSLDNEVHS SFIHRRRLRSQ ERREMQREIL SILGLPHRPR PHLQGGKHNSA PMFMLDLNA MAVEEGGGPG GQGFSYPYKA VFSTQGPPLA SLQDSHFLTD ADMVMSFVNL VEHDKEFFHP RYHHREFRFD LSKIPEGEAV TAAEFRIYKD
	YIRERFDNET FRISVYQVLQ EHLGRESDF LLDSTLWAS EEWLVFDIT ATSNHWVNP RHNGLQLSV ETLGQSINP KLAGLGRHG PQNKQPFMVA FFKATEVHFR SIRSTGSKQR SQNRSKTPKN QEALRMANVA ENSSSDQRQA CKKHLYVVF RDLGWQDWII APEGYAAYC EGECAFLNS YMNATNHAIV QTLVHVINPE TVPKCCAPT QLGAISVLYF DDSSNVILKK YRNMVVRACG CH
SEQ ID NO: 13	DFSLDNEVHS SFIHRRRLRSQ ERREMQREIL SILGLPHRPR PHLQGGKHNSA PMFMLDLNA MAVEEGGGPG GQGFSYPYKA VFSTQGPPLA SLQDSHFLTD ADMVMSFVNL VEHDKEFFHP RYHHREFRFD LSKIPEGEAV TAAEFRIYKD YIRERFDNET FRISVYQVLQ EHLGRESDF LLDSTLWAS EEWLVFDIT ATSNHWVNP RHNGLQLSV ETLGQSINP KLAGLGRHG PQNKQPFMVA FFKATEVHFR SIRSTGSKQR SQNRSKTPKN QEALRMANVA ENSSSDQRQA CKKHLYVVF RDLGWQDWII APEGYAAGYC EGECAFLNS YMNATNHALV QALVHFINPE TVPKCCAPT QLGAISVLYF DDSSNVILKK YRNMVVRACG CH
SEQ ID NO: 14	DFSLDNEVHS SFIHRRRLRSQ ERREMQREIL SILGLPHRPR PHLQGGKHNSA PMFMLDLNA MAVEEGGGPG GQGFSYPYKA VFSTQGPPLA SLQDSHFLTD ADMVMSFVNL VEHDKEFFHP RYHHREFRFD LSKIPEGEAV TAAEFRIYKD YIRERFDNET FRISVYQVLQ EHLGRESDF LLDSTLWAS EEWLVFDIT ATSNHWVNP RHNGLQLSV ETLGQSINP KLAGLGRHG PQNKQPFMVA FFKATEVHFR SIRSTGSKQR SQNRSKTPKN QEALRMANVA ENSSSDQRQA CKKHLYVVF RDLGWQDWII APEGYAAGYC EGECAFLNS YMNATNHALV QTLVHFINPE TVPKCCAPT QLGAISVLYF DDSSNVILKK FRNMVVRACG CH

(continuación)

Variante de Pro-BMP7	Secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO: 15	DFSLDNEVHS SFIHRRRLRSQ ERREMQREIL SILGLPHRPR PHLQGGKHNSA PMFMLDLNA MAVEEGGGPG GQGFSYPYKA VFSTQGPPLA SLQDSHFLTD ADMVMSFVNL VEHDKEFFHP RYHHREFRFD LSKIEGEAV TAAEFRIYKD YIRERFDNET FRISVYQVLQ EHLGRESDF LLDSTRLWAS EEGWLVFDIT ATSNHWVNP RHNLGLQLSV ETLDGQSINP KLAGLIGRHG PQNKQPFMVA FFKATEVHFR SIRSTGSKQR SQNRSKTPKN QEALRMANVA ENSSSDQRQA CKKHELYVSF RDLGWQDWII APEGYAAGYC EGECAPPLNS YMNATNHALV QTLVHFINPE TVPKPCCAPT QLGAISVLYF DDSSNVILKK WRNMVVRACG CH
SEQ ID NO:16	DFSLDNEVHS SFIHRRRLRSQ ERREMQREIL SILGLPHRPR PHLQGGKHNSA PMFMLDLNA MAVEEGGGPG GQGFSYPYKA VFSTQGPPLA SLQDSHFLTD ADMVMSFVNL VEHDKEFFHP RYHHREFRFD LSKIEGEAV TAAEFRIYKD YIRERFDNET FRISVYQVLQ EHLGRESDF LLDSTRLWAS EEGWLVFDIT ATSNHWVNP RHNLGLQLSV ETLDGQSINP KLAGLIGRHG PQNKQPFMVA FFKATEVHFR SIRSTGSKQR SQNRSKTPKN QEALRMANVA ENSSSDQRQA CKKHELYVSF RDLGWQDWII APEGYAAGYC EGECAPPLNS YMNATNHALV QTLVHVINPE TVPKPCCAPT QLGAISVLYF DDSSNVILKK WRNMVVRACG CH

Las proteínas derivadas de BMP7 adecuadas para su uso con los métodos descritos en el presente documento incluyen variantes de pre-BMP7 humana (es decir, SEQ ID NO:1).

En un caso, la proteína derivada de BMP7 es una proteína BMP7 madura que tiene mejores propiedades de bioactividad (p. ej., hasta más de 50 veces o más bioactiva) y biofísicas (p. ej., mejor solubilidad y estabilidad) en comparación con una proteína BMP7 madura de tipo silvestre.

En otro ejemplo, la proteína derivada de BMP7 es BMP7-F9 (SEQ ID NO:8).

En el presente documento, la referencia a una proteína BMP7 de tipo silvestre o a una variante de la misma, incluso haciendo referencia a una SEQ ID NO., se refiere a un homodímero donde cada subunidad monomérica tiene la secuencia identificada. Por ejemplo, la referencia a BMP7-F9 (SEQ ID NO:8) se refiere a un homodímero donde cada subunidad monomérica tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:8 y las subunidades están unidas mediante uno o más enlaces disulfuro.

Para los ensayos funcionales descritos en el presente documento, tratamiento con o administración de una proteína pro-BMP7 particular o variante de la misma, se refiere al tratamiento con o administración de homodímeros de la BMP7 madura particular, es decir, ya sea de tipo silvestre o una variante de la misma, que generalmente están en un complejo no covalente con el prodominio humano de tipo silvestre.

De acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, la puesta en contacto puede llevarse a cabo administrando al sujeto la proteína derivada de BMP7.

El efecto de BMP7 en un sujeto puede depender del Receptor 2 de BMP (BMPR2), cuya expresión se ha demostrado que se correlaciona inversamente con la recidiva y la metástasis ósea en pacientes con cáncer de próstata (Kobayashi et al., "Bone Morphogenetic Protein 7 in Dormancy and Metastasis of Prostate Cancer Stem-Like Cells in Bone", J. Exp. Med. 208(13):2641-55 (2011)). Por tanto, en un caso, las CCD de un sujeto que se han puesto en contacto, son positivas para el receptor de la proteína morfogenética ósea (BMPR⁺).

Los métodos descritos en el presente documento pueden implicar además la administración al sujeto de un agente

quimioterápico, un agente inmunoterápico, un agente epigenético o radiación ionizante.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente quimioterápico" se refiere a un compuesto sintético, biológico o semisintético que no es una enzima y que destruye las células cancerosas o inhibe el crecimiento de las mismas mientras que tiene menos efecto sobre las células no cancerosas. Puede utilizarse cualquier agente quimioterápico adecuado.

Como agentes quimioterápicos adecuados se incluyen, sin limitación, una antraciclina, un taxano, un inhibidor de cinasa, un anticuerpo, una fluoropirimidina y un fármaco de platino. Las antraciclinas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, mitoxantrona e idarrubicina. Los taxanos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, docetaxel y paclitaxel. Los inhibidores de cinasa ilustrativos incluyen, pero sin limitación, lapatinib, mesilato de imatinib y genefitinib. Los anticuerpos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, alemtuzumab, gemtuzumab, ozogamicina, rituximab, trastuzumab e ibritumomab tiuxetan. Las fluoropirimidinas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, 5-fluorouracilo, capecitabina, tegafur, tegafur-uracilo, floxuridina, 5-fluorodesoxiuridina y S-1. Los fármacos de platino ilustrativos incluyen, pero sin limitación, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino y nedaplatino.

Otros agentes quimioterápicos adecuados incluyen, sin limitación, agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, tiotepa, hexametilmelamina, busulfán, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, decarbazina, estramustina, estreptozocina y temozolomida), alcaloides de la vinca (p. ej., vinblastina, vincristina y vinorelbina), podofilotoxina (p. ej., etopósido y tenipósido), antibióticos (p. ej., bleomicina, dactinomicina, mitomicina y valrubicina) y análogos de camptotecina (p. ej., irinotecán o topotecán).

En algunas realizaciones, el agente quimioterápico es un agente quimioterápico anti-HER2 seleccionado de trastuzumab (Herceptin®) y lapatinib (Tykerb®). Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal que se dirige al receptor HER2/neu de las células cancerosas. Lapatinib es un inhibidor de tirosina cinasa que se dirige al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y a HER2.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente inmunoterápico" se refiere a un agente que es capaz de inducir o potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto. En el contexto del cáncer, los agentes inmunoterápicos estimulan el sistema inmunitario para dirigirse de una manera más eficaz a las células cancerosas. Los agentes inmunoterápicos adecuados pueden seleccionarse de un inhibidor del punto de control inmunitario, un interferón y una vacuna tumoral.

Los inhibidores del punto de control inmunitario son compuestos que inhiben la participación de los puntos de control inmunitarios. Los agentes moduladores de puntos de control inmunitarios ilustrativos incluyen inhibidores de PD-1 (p. ej., pembrolizumab y nivolumab), inhibidores de PD-L1 (p. ej., atezolizumab, avelumab y durvalumab) e inhibidores de CTLA-4 (p. ej., ipilimumab).

Los interferones ("IFN") son una familia de citocinas que protegen contra enfermedades mediante efectos directos sobre las células diana y activando respuestas inmunitarias. Los IFN pueden producirse por, y actuar sobre, las células tanto tumorales como inmunitarias. Los IFN de tipo I comprenden proteínas IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ e IFN ω . Se sabe que los IFN de tipo I actúan como mediadores en los efectos antineoplásicos contra varias neoplasias malignas (Moschos et al., *Interferons in the Treatment of Solid Tumors*, *Cancer Treat. Res.* 126:207-241 (2005)).

Como se usa en el presente documento, la expresión "vacuna tumoral" se refiere a una composición que estimula una respuesta inmunitaria en un sujeto contra una célula tumoral o cancerosa. Las vacunas tumorales suelen estar compuestas por una fuente de material o células (antígeno) asociadas al cáncer, que pueden ser autólogas (de uno mismo) o alogénicas (de otros) para el sujeto, junto con otros componentes (p. ej., adyuvantes) para estimular y reforzar además la respuesta inmunitaria contra el antígeno. Las vacunas tumorales pueden estimular el sistema inmunitario del sujeto para que produzca anticuerpos contra uno o varios antígenos específicos y/o para que produzca linfocitos T citotóxicos para atacar a las células cancerosas que tienen esos antígenos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente epigenético" se refiere a un agente que altera el estado epigenético (p. ej., estado de metilación) del ADN de una célula al ponerse en contacto, o después de ponerse en contacto con dicho agente o con la administración del mismo.

Los agentes epigenéticos adecuados pueden seleccionarse de, p. ej., un inhibidor de histona desacetilasa ("HDAC, *histone deacetylase*"), 5-azacitidina, ácido retinoico, trióxido de arsénico, inhibidor de la subunidad 2 del complejo represivo potenciador de Zeste 2 Polcomb ("EZH2"), inhibidor de bromodominio ("BRD") y derivados de los mismos.

Los inhibidores de HDAC ilustrativos incluyen, pero sin limitación, tricotatina A, trapoxina B, benzamidas, fenilbutirato, ácido valproico, vorinostat, belinostat, LAQ824, panobinostat, entinostat, CI994 y mocetinostat.

Los inhibidores de EZH2 ilustrativos incluyen, pero sin limitación, 3-desazaneplanocina A (DZNep), EPZ005687, GSK126, EI1, UNC1999 y EPZ-6438 (Kim et al., "Targeting EZH2 in Cancer", *Nat. Med.* 22(2): 128-134 (2016)).

Los inhibidores de bromodominio ilustrativos incluyen, sin limitación, JQ1, I-BET151/762, PF-1 y RVX-208 (Wadhwa et al., "Bromodomain Inhibitor Review: Bromodomain and Extra-terminal Family Protein Inhibitors as a Potential New Therapy in Central Nervous System Tumors", *Cureus* 8(5):e620 (2016)).

- 5 Otros agentes epigenéticos ilustrativos incluyen inhibidores de ADN metil transferasa (DNMT) incluyendo, pero sin limitación, azacitidina y decitabina.

El microambiente de CCD/CTD desempeña un papel fundamental en la mejora de la latencia. El miembro 1 del grupo F de la subfamilia 2 de receptores nucleares (NR2F1) es un receptor hormonal nuclear y un regulador de la transcripción que es un nodo clave en una red de factores de transcripción que constituye una firma distintiva de latencia de células tumorales. Cuando se aplica a los perfiles de expresión génica de pacientes con cáncer de mama positivos a receptores de estrógenos (ER⁺), se ha demostrado que esta firma distintiva predice períodos más largos sin metástasis (Kim et al., "Dormancy Signatures and Metastasis in Estrogen Receptor Positive and Negative Breast Cancer", *PloS One* 7:e35569 (2012)). Esta firma distintiva de latencia también se ha encontrado en CTD latentes de pacientes con cáncer de próstata que habían sido asintomáticos durante 7 a 18 años (Sosa et al., "NR2F1 Controls Tumour Cell Dormancy via SOX9- and RARbeta-Driven Quiescence Programmes", *Nat. Commun.* 6:6170 (2015) y Chery et al., "Characterization of Single Disseminated Prostate Cancer Cells Reveals Tumor Cell Heterogeneity and Identifies Dormancy Associated Pathways", *Oncotarget* 5:9939-51 (2014)), destacando su relevancia para las enfermedades humanas.

Se ha demostrado que NR2F1 regula positivamente e induce la latencia de células tumorales residuales locales y distantes después de la cirugía tumoral en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente (PDX, *patient-derived xenograft*) de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) (Sosa, "Dormancy Programs as Emerging Antimetastasis Therapeutic Alternatives", *Mol. Cell. Oncol.* 3(1):e1029062 (2016)). La plasticidad de la expresión de NR2F1 sugiere que los cambios en el epigenoma de las células tumorales residuales pueden controlarse mediante señales externas e internas y sentenciar el destino de las CCD. Se ha demostrado que NR2F1 limita la reprogramación de células madre pluripotentes inducidas (iPS, *induced pluripotent stem cell*), probablemente modulando la reprogramación de la cromatina (Onder et al., "Chromatin Modifying Enzymes as Modulators of Reprogramming", *Nature* 483(7391):598-602 (2012)). NR2F1 también es clave en el mantenimiento de una cromatina globalmente represiva en células tumorales latentes, al tiempo que permite un estado de cromatina activa en los promotores de genes de latencia específicos, incluido su propio promotor (Sosa et al., "NR2F1 Controls Tumour Cell Dormancy via SOX9- and RARbeta-Driven Quiescence Programmes", *Nat. Commun.* 6:6170 (2015)), lo que pone de relieve la existencia de un programa epigenético orquestado modulado por NR2F1 y las señales microambientales que conducen a la latencia de las células tumorales. En una realización, las CTD son NR2F1⁺.

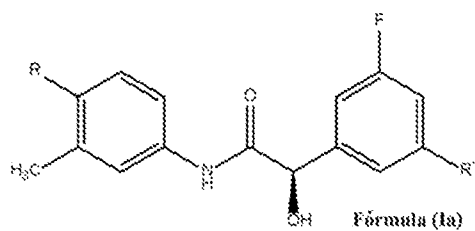
Se ha demostrado que las CCD expresan altos niveles de activación de la vía PERK (Bragado et al., "Microenvironments Dictating Tumor Cell Dormancy", *Recent Results Cancer Res.* 195:25-39 (2012); Sosa et al., "Regulation of Tumor Cell Dormancy by Tissue Microenvironments and Autophagy", *Adv. Exp. Med. Biol.* 734:73-89 (2013); Goswami et al., "The Phosphoinositide 3-Kinase/Akt1/Par-4 Axis: A Cancer-Selective Therapeutic Target", *Cancer Res.* 66(6):2889-92 (2006); y Schewe et al., "ATF6alpha-Rheb-mTOR Signaling Promotes Survival of Dormant Tumor Cells *in vivo*", *PNAS* 105(30): 10519-24 (2008)), que es un mediador de la ISR (*Integrated Stress Response*, respuesta integrada al estrés). La señalización de la ISR a través de la fosforilación de PERK y EIF2α da como resultado una disminución en la traducción general, así como aumentos en la traducción específica de genes, estrés oxidativo y producción de ROS (*Reactive Oxygen Species*, especies reactivas del oxígeno), degradación de proteínas, degradación de ARN, autofagia y biosíntesis de lípidos, lo que puede ayudar a la supervivencia de las células tumorales.

El aspecto reivindicado se refiere a un método de tratamiento de cáncer residual mínimo en un sujeto, cuyo método implica poner en contacto células cancerosas diseminadas (CCD) de un sujeto con un inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK) seleccionado de LY2, LY3 y LY4, donde dicha puesta en contacto erradica las CCD del sujeto para tratar un cáncer residual mínimo del sujeto.

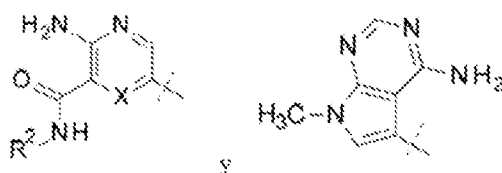
En una realización, la CCD son fosfo-PERK activo. Por consiguiente, el método puede implicar además poner en contacto las CCD del sujeto con un inhibidor de PERK, un inhibidor de MEK, un inhibidor de CDK4/6 o cualquier combinación de los mismos.

La puesta en contacto puede llevarse a cabo administrando al sujeto un inhibidor de PERK.

De otro modo, se desvela en donde el inhibidor de PERK es un compuesto de fórmula (I)



donde R se selecciona del grupo que consiste en



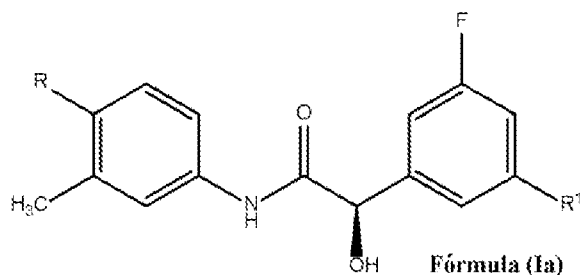
X es CH o N;

R¹ es hidrógeno o halógeno (p. ej., flúor); y

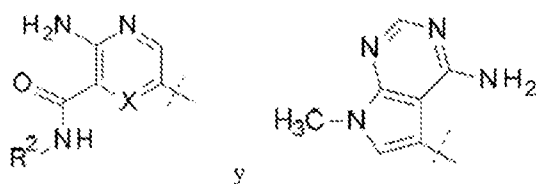
R² es alquilo C₁ a C₃;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

De otro modo, se desvela en donde el inhibidor de PERK es un compuesto de fórmula (Ia)



donde R se selecciona del grupo que consiste en



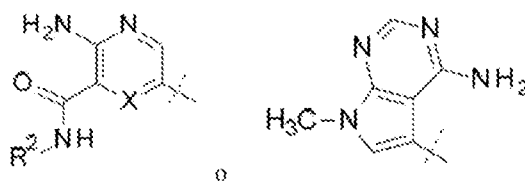
X es CH o N;

R¹ es hidrógeno o halógeno (p. ej., flúor); y

R² es alquilo C₁ a C₃;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Cuando el inhibidor es un compuesto de fórmula (I) o de fórmula (Ia), R puede ser



Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" significa un grupo hidrocarburo alifático que puede ser lineal o ramificado y que tiene aproximadamente de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono o de 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono en la cadena (o el número de carbonos designado por " $C_n.C_n$ ", dónde n es el intervalo numérico de átomos de carbono). Ramificado significa que uno o más grupos alquilo inferior tales como metilo, etilo o propilo están unidos a una cadena de alquilo lineal. Ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo e i-propilo.

El término "halógeno" significa flúor, cloro, bromo o yodo. En un caso, halógeno es flúor.

El término "compuesto(s)" y expresiones equivalentes, significan compuestos descritos en el presente documento, cuya expresión incluye los profármacos, las sales farmacéuticamente aceptables, los óxidos y los solvatos, p. ej., hidratos, cuando el contexto lo permita.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden contener uno o más centros asimétricos y por tanto pueden dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas. Cada centro quiral puede definirse en términos de estereoquímica absoluta, como (R)- o (S)-. La presente invención pretende incluir todos estos posibles isómeros, así como sus mezclas, incluyendo formas racémicas y ópticamente puras. Usando sintones quirales o reactivos quirales pueden prepararse isómeros ópticamente activos (R) y (S), (-) y (+), o (D) y (L) o resolverse usando técnicas convencionales. También se pretende que todas las formas tautoméricas estén incluidas.

La mención de "un compuesto" pretende incluir sales, solvatos, óxidos y complejos de inclusión de ese compuesto, así como cualquier forma estereoisomérica, o una mezcla, de cualquiera de dichas formas de ese compuesto en cualquier proporción. Por tanto, de acuerdo con algunas realizaciones, un compuesto como se describe en el presente documento, incluso en los contextos de composiciones farmacéuticas, métodos de tratamiento y compuestos de por sí, se proporciona en forma de sal.

El término "solvato" se refiere a un compuesto en estado sólido, en donde las moléculas de un disolvente adecuado se incorporan en la red cristalina. Un disolvente adecuado para la administración terapéutica es fisiológicamente tolerable a la dosis administrada. Son ejemplos de disolventes adecuados para la administración terapéutica etanol y agua. Cuando el agua es el disolvente, el solvato se denomina hidrato. En general, los solvatos se forman disolviendo el compuesto en el disolvente apropiado y aislando el solvato mediante enfriamiento o usando un antidisolvente. El solvato normalmente se seca o se destila azeotrópicamente en condiciones ambientales.

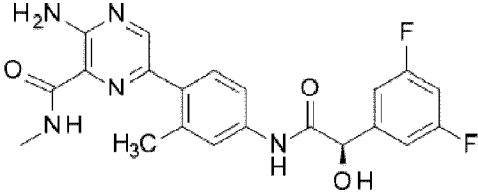
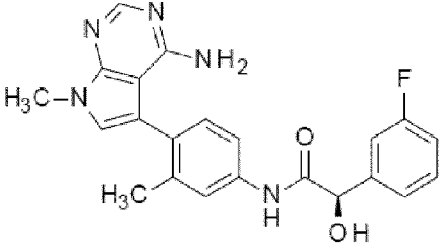
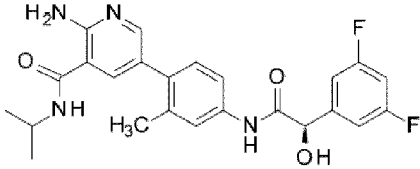
Los complejos de inclusión se describen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19ª ed. 1:176-177 (1995). Los complejos de inclusión más comúnmente empleados son aquellos con ciclodextrinas, y todos los complejos de ciclodextrina, naturales y sintéticos, también se incluyen específicamente en la presente invención.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales preparadas a partir de ácidos o bases no tóxicos farmacéuticamente aceptables que incluyen ácidos y bases inorgánicos y ácidos y bases orgánicos.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que es, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuado para su uso en contacto con las células humanas y de animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y que es proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

Los inhibidores de PERK adecuados se seleccionan de LY2, LY3, LY4, y combinaciones de los mismos (véase la Tabla 4 a continuación). El inhibidor de PERK puede ser una sal farmacéuticamente aceptable de LY2, LY3 y/o LY4.

Tabla 4. Inhibidores de PERK ilustrativos

Compuesto	Nombre químico	Estructura
LY2	3-amino-6-[4-[[[(2R)-2-(3,5-difluorofenil)-2-hidroxi-acetil]amino]-2-metilfenil]-N-metil-pirazin-2-carboxamida	
LY3	(2R)-N-[4-(4-amino-7-metil-pirrólo[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metil-fenil]-2-(3-fluorofenil)-2- hidroxiacetamida	
LY4	2-amino-5-[4-[[[(2R)-2-(3,5-difluorofenil)-2-hidroxi-acetil]amino]-2-metilfenil]-N-isopropil-piridin-3-carboxamida	

En algunas realizaciones, la puesta en contacto se realiza con un inhibidor de PERK que no inhibe EIF2AK1, EIF2AK2 o EIF2AK4.

5 En una realización, el inhibidor PERK no inhibe AXL. De acuerdo con esta realización, el inhibidor PERK se selecciona de LY3 y LY4.

10 En otra realización, el inhibidor PERK no inhibe Flt3, MNK2 o NTRK. De acuerdo con esta realización, el inhibidor de PERK es LY4.

De otro modo, se desvela en donde la puesta en contacto se lleva a cabo administrando al sujeto un inhibidor de MEK. En la técnica se conocen bien inhibidores de MEK ilustrativos e incluyen, por ejemplo, PD184352, PD318088, PD98059, PD334581, RDEA119/BAY 869766 (véase, p. ej., Iverson et al., "RDEA119BAY 869766: A Potent, Selective, Allosteric Inhibitor of MEK1/2 for the Treatment of Cancer", Cancer Res. 69(17):6839-47 (2009)).

De otro modo, se desvela en donde la puesta en contacto se lleva a cabo administrando al sujeto un inhibidor de CDK4/6. En la técnica se conocen bien inhibidores de CDK4/6 ilustrativos e incluyen, por ejemplo, Abemaciclib (LY2835219), palbociclib (PD0332991) y ribociclib (LEE011).

En una realización, el método puede implicar además seleccionar un sujeto sin pruebas de enfermedad antes de dicha puesta en contacto. Por ejemplo, antes de dicha puesta en contacto, el cáncer del sujeto puede estar en remisión.

Al llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento, se trata un cáncer residual mínimo en un sujeto. Dicho tratamiento puede incluir, sin limitación, administrar a un sujeto que necesite tratamiento para un cáncer residual mínimo, uno o más compuestos eficaces para tratar la afección del sujeto (es decir, cáncer o cáncer residual mínimo).

En una realización, los métodos de tratamiento de la presente divulgación se llevan a cabo en condiciones eficaces para inducir la latencia en células tumorales diseminadas ("CTD") y/o para inducir la muerte de CTD latentes.

Al llevar a cabo los métodos de tratamiento de la presente divulgación, la administración de compuestos a un sujeto puede implicar la administración de composiciones farmacéuticas que contienen el (los) compuesto(s) (es decir, un inhibidor de PERK como se reivindica, o una proteína derivada de BMP7 como se desvela de otro modo) en cantidades terapéuticamente eficaces, lo que significa una cantidad de compuesto eficaz en el tratamiento de las afecciones y/o trastornos indicados en el sujeto. Dichas cantidades suelen variar en función de una serie de factores que están al alcance de los expertos en la materia. Estas incluyen, sin limitación, el sujeto en particular, así como la edad del sujeto, el peso, la altura, el estado físico general y el historial médico, el compuesto particular usado, así como el vehículo en

el que se formula y la vía de administración seleccionada para ello; el tiempo o la duración del tratamiento; la naturaleza y gravedad de la afección que se va a tratar.

La administración normalmente implica administrar formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables, lo que significa formas farmacéuticas de los compuestos descritos en el presente documento e incluye, por ejemplo, comprimidos, grageas, polvos, elixires, jarabes, preparaciones líquidas, incluyendo suspensiones, pulverizaciones, comprimidos inhalantes, pastillas para chupar, emulsiones, soluciones, gránulos, cápsulas y supositorios, así como preparaciones líquidas para inyecciones, incluyendo preparaciones de liposomas. Técnicas y formulaciones en general se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edición.

Al llevar a cabo los métodos de tratamiento de la presente divulgación, el fármaco (es decir, un inhibidor de PERK como se reivindica, o una proteína derivada de BMP7 como se desvela de otro modo) puede estar contenido, en cualquier cantidad adecuada, en cualquier sustancia transportadora adecuada. El fármaco puede estar presente en una cantidad de hasta el 99 % en peso del peso total de la composición. La composición puede proporcionarse en una forma farmacéutica que sea adecuada para la vía de administración oral, parenteral (p. ej., intravenosa, intramuscular), rectal, cutánea, nasal, vaginal, inhaladora, cutánea (parche) u ocular. Por tanto, la composición puede estar en forma de, p. ej., comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles, incluidos hidrogeles, pastas, pomadas, cremas, emplastos, macerados, dispositivos de suministro osmótico, supositorios, enemas, inyectables, implantes, pulverizaciones o aerosoles.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación pueden formularse para liberar el fármaco activo de manera sustancialmente inmediata tras la administración o en cualquier momento o periodo de tiempo predeterminado después de la administración.

Las formulaciones de liberación controlada incluyen (i) formulaciones que crean una concentración sustancialmente constante del fármaco (o fármacos) dentro del organismo durante un periodo de tiempo prolongado; (ii) formulaciones que después de un tiempo de espera predeterminado crean una concentración sustancialmente constante del fármaco (o fármacos) dentro del organismo durante un periodo de tiempo prolongado; (iii) formulaciones que mantienen la acción del fármaco (o fármacos) durante un periodo de tiempo predeterminado, manteniendo en el organismo, un nivel eficaz, relativamente constante del fármaco, con minimización simultánea de efectos secundarios indeseables asociados a fluctuaciones en el nivel plasmático del fármaco activo; (iv) formulaciones que localizan la acción del fármaco (o fármacos), p. ej., mediante la colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente a o en la(s) célula(s), tejido(s) u órgano(s) enfermo(s); y (v) formulaciones que se dirigen a la acción del fármaco (o fármacos) utilizando vehículos o derivados químicos para suministrar el fármaco a un tipo de célula diana particular.

Puede preferirse la administración de fármacos en forma de formulación de liberación controlada en casos en los que el fármaco tenga (i) un índice terapéutico estrecho (es decir, que la diferencia entre la concentración en plasma que conduce a efectos secundarios o a reacciones tóxicas perjudiciales y la concentración en plasma que conduce a un efecto terapéutico, sea pequeña; en general, el índice terapéutico (IT) se define como la relación entre la dosis letal mediana (DL_{50}) y la dosis efectiva mediana (DE_{50})); (ii) una estrecha ventana de absorción en el tubo gastrointestinal; o (iii) una semivida biológica muy corta, de modo que se requiere una dosificación frecuente durante un día para mantener el nivel plasmático a un nivel terapéutico.

Se puede seguir cualquiera de diversas estrategias para obtener una liberación controlada en la que la tasa de liberación supere la tasa de metabolismo del fármaco en cuestión. La liberación controlada se puede obtener mediante la selección adecuada de varios parámetros e ingredientes de la formulación, lo que incluye, p. ej., varios tipos de composiciones y recubrimientos de liberación controlada. Por tanto, el fármaco se formula con excipientes apropiados en una composición farmacéutica que, tras la administración, libera el fármaco de manera controlada (composiciones de cápsulas o comprimidos de una o varias unidades, soluciones de aceite, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, parches y liposomas).

Por tanto, la administración según los métodos de la presente divulgación se puede realizar por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, mediante instilación intranasal, mediante instilación intracavitaria o intravesical, por vía intraocular, intraarterial, intralesional o mediante la aplicación a la membrana mucosa. Los compuestos pueden administrarse solos o con transportadores farmacéuticos adecuados y pueden estar en forma sólida o líquida, tal como en comprimidos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones.

El fármaco (es decir, un inhibidor de PERK como se reivindica, o una proteína derivada de BMP7 como se desvela de otro modo) se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte, o con un transportador comestible asimilable, o puede incluirse en cápsulas de cubierta dura o blanda, o puede comprimirse en comprimidos o puede incorporarse directamente con los alimentos de la dieta. Para la administración terapéutica oral, el fármaco puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes y similares. Dichas composiciones y preparaciones deberían contener al menos un 0,001 % de compuesto activo. El porcentaje de compuesto activo en estas composiciones puede, por supuesto, modificarse y de forma conveniente

puede ser entre aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 10 % del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en dichas composiciones terapéuticamente útiles es de tal forma que se obtenga una dosificación adecuada. En una realización, las composiciones se preparan de manera que una unidad de dosificación oral contenga entre aproximadamente 1 µg y 1 g de compuesto activo.

5 Los comprimidos, las cápsulas y similares también pueden contener un aglutinante tal como goma de tragacanto, goma arábica, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico; un lubricante, tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, puede
10 contener, además de materiales del tipo anterior, un transportador líquido, tal como un aceite graso.

Puede haber otros materiales diversos en forma de recubrimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos pueden estar recubiertos con goma laca, con azúcar o con ambos. Un jarabe puede contener, además del principio activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como
15 conservantes, un colorante y un aromatizante tal como de cereza o naranja.

El compuesto terapéutico también puede administrarse por vía parenteral. Las soluciones o suspensiones se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites. Son aceites
20 ilustrativos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite mineral. En general, los transportadores líquidos preferidos son el agua, la solución salina, la dextrosa acuosa y la solución de azúcares relacionados, y glicoles tales como, propilenglicol, hialuronano y sus derivados, carboximetilcelulosa y otros derivados de polisacáridos solubles o polietilenglicol, particularmente para soluciones inyectables. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para
25 prevenir el crecimiento de microorganismos si no se producen de forma aséptica.

Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que pueda inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones
30 de fabricación y almacenamiento y debe protegerse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.

El agente terapéutico también puede administrarse directamente a las vías respiratorias en forma de aerosol. Para su uso como aerosoles, el agente terapéutico en solución o suspensión puede envasarse en un recipiente de aerosol presurizado junto con propulsores adecuados, por ejemplo, propulsores de hidrocarburos como propano, butano o isobutano con adyuvantes convencionales. El agente terapéutico también se puede administrar en forma no
35 presurizada, tal como en un nebulizador o atomizador.

40 En una realización, la administración puede aumentar la cantidad de CCD latentes detectables en un sujeto en al menos aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más.

45 En otra realización, la administración puede disminuir la cantidad de CCD detectables en un sujeto en al menos aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más.

50 Dentro del contexto de la presente divulgación, "tratar" significa mantener la ausencia de evidencia de enfermedad sintomática (p. ej., cáncer) en un sujeto.

En una realización, el término "tratar" o "tratamiento" designa en particular la eliminación de cáncer residual mínimo en un sujeto. El término tratamiento incluye la inducción de la latencia en las CCD. El término tratamiento también incluye la eliminación de CCD latentes en el sujeto. El término tratamiento también incluye una disminución en la
55 cantidad o número de CCD latentes detectables en un sujeto.

El aspecto reivindicado se refiere a un método de tratamiento de cáncer residual mínimo en un sujeto. Este método implica poner en contacto células cancerosas diseminadas (CCD) de un sujeto con un inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK) seleccionado de LY2, LY3 y LY4, donde dicha puesta en contacto erradica las CCD del sujeto para tratar un cáncer residual mínimo del sujeto.
60

Como se ha descrito anteriormente, los métodos de la presente divulgación son adecuados para tratar cáncer residual mínimo en un sujeto al que se le ha diagnosticado uno cualquiera o más de cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, linfoma de células del manto, leucemia, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, melanoma, cánceres de piel, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma, neuroblastoma, cáncer colorrectal y otros cánceres.
65

El cáncer puede ser un cáncer de mama seleccionado de cáncer de mama invasivo, carcinoma ductal *in situ* (CDIS), carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS) y cáncer de mama inflamatorio.

- 5 En una realización, el cáncer de mama es un cáncer de mama HER2⁺.

En otra realización, al sujeto se le ha diagnosticado tener células tumorales diseminadas y/o un cáncer no metastásico.

- 10 Como se ha descrito anteriormente, los métodos de la presente divulgación pueden implicar además administrar al sujeto un agente quimioterápico, un agente inmunoterápico, un agente epigenético o radiación ionizante.

- 15 Cuando se administra un agente quimioterápico al sujeto, el agente quimioterápico puede ser un agente quimioterápico anti-HER2 seleccionado de trastuzumab (Herceptin®) y lapatinib (Tykerb®). En otra realización, el agente quimioterápico puede seleccionarse de una antraciclina, un taxano, un inhibidor de cinasa, un anticuerpo, una fluoropirimidina y un fármaco de platino.

Cuando se administra un agente inmunoterápico al sujeto, el agente inmunoterápico se selecciona de un inhibidor del punto de control inmunitario, un interferón o una vacuna tumoral.

- 20 Cuando se administra un agente epigenético al sujeto, el agente epigenético puede seleccionarse de un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC), 5-azacitidina, ácido retinoico, trióxido de arsénico, un inhibidor de la subunidad 2 del complejo represivo potenciador de Zeste 2 Polcomb ("EZH2"), un inhibidor de bromodominio (BRD), y derivados de los mismos.

- 25 La puesta en contacto se puede llevar a cabo administrando el inhibidor de PERK al sujeto. Los inhibidores de PERK para su uso según la invención son LY2, LY3 y LY4. De otro modo, se desvelan inhibidores de PERK adecuados descritos en detalle anteriormente.

- 30 En una realización, el método implica además detectar la presencia de CTD en el sujeto antes de dicha puesta en contacto. Como se ha descrito con mayor detalle anteriormente, las CTD pueden ser NR2F1⁺, fosfo-PERK activo y/o BMPR⁺.

- 35 El método puede implicar además poner en contacto las CCD/CTD del sujeto con una proteína derivada de BMP7. En una realización, la puesta en contacto de las CCD/CTD del sujeto con una proteína derivada de BMP7 se lleva a cabo administrando al sujeto la proteína derivada de BMP7. Anteriormente se han descrito proteínas derivadas de BMP7 adecuadas. En una realización, la proteína derivada de BMP7 es BMP7-F9.

En una realización, el inhibidor de PERK no inhibe EIF2AK1, EIF2AK2 o EIF2AK4.

- 40 Como se ha descrito anteriormente, el sujeto puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

En una realización, el método puede implicar además seleccionar un sujeto sin pruebas de enfermedad antes de dicha puesta en contacto. Por ejemplo, antes de dicha puesta en contacto, el cáncer del sujeto puede estar en remisión.

- 45 De otro modo, en el presente documento se desvela otro aspecto que se refiere a un método de tratamiento de un cáncer en estadio terminal en un sujeto. Este método implica poner en contacto células cancerosas diseminadas (CCD) de un sujeto con un inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK) seleccionado de LY2, LY3 y LY4, donde dicha puesta en contacto erradica las CTD del sujeto para tratar un cáncer residual mínimo del sujeto.

- 50 Como se usa en el presente documento, la expresión "cáncer en estadio terminal" se refiere a un cáncer en estadio II, estadio III y/o IV, o a cualquier cáncer que haya metastatizado. Se apreciará que un médico puede determinar la naturaleza del cuadro clínico del cáncer en "estadio terminal".

- 55 Como se ha descrito en detalle anteriormente, al sujeto se le puede haber diagnosticado cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, linfoma de células del manto, leucemia, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, melanoma, cánceres de piel, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma, neuroblastoma o cáncer colorrectal.

- 60 En un caso, el cáncer es cáncer de mama seleccionado de cáncer de mama invasivo, carcinoma ductal *in situ* (CDIS), carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS) y cáncer de mama inflamatorio. El cáncer de mama puede ser un cáncer de mama HER2⁺.

- 65 El método puede implicar además administrar al sujeto un agente quimioterápico, un agente inmunoterápico, un agente epigenético o radiación ionizante. En un caso, el agente quimioterápico es un agente quimioterápico anti-HER2 seleccionado de trastuzumab (Herceptin®) y lapatinib (Tykerb®). En otro ejemplo, el agente quimioterápico se

selecciona de una antraciclina, un taxano, un inhibidor de cinasa, un anticuerpo, una fluoropirimidina y un fármaco de platino. El agente inmunoterápico puede seleccionarse de un inhibidor del punto de control inmunitario, un interferón o una vacuna tumoral. El agente epigenético puede seleccionarse de un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC), 5-azacitidina, ácido retinoico, trióxido de arsénico, un inhibidor de la subunidad 2 del complejo represivo potenciador de Zeste 2 Polcomb (EZH2), un inhibidor de bromodominio (BRD), y derivados de los mismos.

La puesta en contacto puede llevarse a cabo administrando al sujeto el inhibidor de PERK.

El método puede implicar además detectar la presencia de CCD/CTD en el sujeto antes de dicha puesta en contacto.

Como se ha descrito anteriormente, las CTD pueden ser NR2F1⁺ o fosfo-PERK activo.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Materiales y métodos para los ejemplos 2-6

Reactivos, cultivo celular y tratamientos: El EGF se obtuvo en PeproTech (Rocky Hill, Nueva Jersey) y se utilizó a 100 ng/ml. La taspigargina procedía de Sigma (St. Louis, MO) y se utilizó a 2 nM. La línea celular ZR75.1-H2B-Dendra2 se generó mediante transfección estable del plásmido H2B-Dendra2 (Gurskaya et al., "Engineering of a Monomeric Green-to-Red Photoactivatable Fluorescent Protein Induced by Blue Light", Nat. Biotechnol. 24:461-465 (2006)). Para los cultivos 3D, las células MCF10A-HER2, SKBR3 y ZR75.1-H2B-Dendra2 se sembraron en placas en Matrigel con factor de crecimiento reducido (Corning, Corning, NY) y se cultivaron como se ha descrito anteriormente (Avivar-Valderas et al., "Regulation of Autophagy during ECM Detachment is Linked to a Selective Inhibition of mTORC1 by PERK", Oncogene 32(41):4932-40 (2013)). Cuando se hace referencia a "baja densidad", se refiere a que sembraron 3.500 células/8 pocillos y cuando es a "alta densidad" se refiere a 20.000 células/8 pocillos. Los tratamientos con vehículo (DMSO) o LY4 (2 µM) se reemplazaron cada 24 horas para cultivos 2D y cada 48 horas para cultivos 3D.

Ratones, crecimiento tumoral y procesamiento tisular: La cepa de ratón FVB/N-Tg (MMTVneu) se obtuvo en Jackson Laboratories (Sacramento, CA). Estos ratones expresan la forma neu inactivada (HER2) bajo el control transcripcional del promotor/potenciador del virus del tumor mamario de ratón. Antes de utilizarse en cualquier experimento, las hembras se sometieron a una ronda de gestación y al menos a dos semanas sin lactancia después del destete. A las hembras de entre 24 y 32 semanas de vida se las inyectó diariamente, por vía intraperitoneal, vehículo (aceite de maíz al 90 %, etanol al 10 %) o LY4 (50 mpk), durante dos semanas. Para el tratamiento combinado, hembras de 24 a 32 semanas de vida se trataron diariamente mediante sonda oral con Abemaciclib (50 mpk) durante 4 semanas antes de comenzar el tratamiento descrito anteriormente con LY4. Los volúmenes tumorales se midieron utilizando la fórmula $(Dxd^2)/2$, donde D es el diámetro más largo y d el más corto. Para el recuento de CTC, los animales se anestesiaron y se extrajo sangre completa mediante punción cardíaca. Las glándulas mamarias, los pulmones y los tumores se extirparon y se fijaron en formol tamponado al 10 % durante la noche antes de su inclusión en parafina. La médula ósea de las dos extremidades inferiores se lavó con una aguja de 26 G y se procesó adicionalmente mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Para la detección de CTC y CTD en la médula ósea, se redujeron las células hematopoyéticas maduras de los tejidos mediante separación con perlas magnéticas marcadas con anticuerpos anti-ratón (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) antes de la fijación en formol durante 20 minutos a 4 °C.

Tinción de una preparación microscópica completa de glándula mamaria: Las glándulas mamarias fijadas en formol tamponado al 10 % se incubaron en tinte de alumbre carmín (carmín 0,2 %, sulfato de aluminio y potasio 0,5 %) (Sigma, St. Louis, MO) durante 2 días. Posteriormente, se deshidrataron y se transfirieron a una solución de salicilato de metilo antes de obtener imágenes con un estereomicroscopio.

IHQ e IF: La IHQ y la IF de secciones incluidas en parafina se realizaron como se ha descrito anteriormente (Avivar-Valderas et al., "Regulation of Autophagy during ECM Detachment is Linked to a Selective Inhibition of mTORC1 by PERK", Oncogene 32(41):4932-40 (2013)). En resumen, los portaobjetos se desparafinaron y se rehidrataron en serie. La recuperación termoinducida del antígeno se realizó en tampón citrato (10 mM, pH 6), tampón EDTA (1 mM, pH 8) o Tris/EDTA (pH 9). Los portaobjetos se permeabilizaron adicionalmente en Triton™-X100 al 0,1 %, se bloquearon y se incubaron con anticuerpo primario durante la noche a 4 °C en una dilución de 1:50-1:200. Para la IHQ, antes de la incubación con el anticuerpo primario, se realizó una etapa adicional de desactivación con peroxidasa endógena y avidina/biotina. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-citoqueratina 8/18 (Progen, Heidelberg, Alemania), actina-Cy3 del músculo liso (Sigma, St. Louis, MO), P-PERK(T980) (Tenkerian et al., "mTORC2 Balances AKT Activation and eIF2alpha Serine 51 Phosphorylation to Promote Survival Under Stress", Mol. Cancer Res. 13:1377-1388 (2015)), P-EIF2A, Caspasa 3 escindida, P-H3(S10), P-HER2(Y1221/1222) (Cell signaling, Danvers, MA), P-Rb(S249/T252) (Santa Cruz, Dallas, TX), HER2 (Abcam, Cambridge, MA), HER2 (Millipore, Darmstadt, Alemania), Ki67 (eBioscience y Abcam), cóctel de citoqueratinas (C11 y ck7, Abcam; AE1 y AE3, Millipore) y GADD34 (Santa Cruz). A continuación, los portaobjetos se incubaron en anticuerpos secundarios (Life Technologies, Norwalk, CT) y se montaron. Para la IHQ, las secciones se procesaron utilizando el kit VectaStain ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y el kit de sustrato DAB para marcaje de peroxidasa (Vector Laboratories) y se montaron en medio VectaMount (Vector Laboratories). Para la IF, las secciones se montaron en medio acuoso ProLong Gold Antifade (Thermo Fisher, Waltham, MA).

En el caso de inmunocitofluorescencia, se prepararon cytopspines de células fijadas (se prepararon 100.000 - 200.000 células/cytopspin mediante citocentrifugación a 500 rpm durante 3 minutos en portaobjetos poly-prep, y el protocolo de tinción se realizó como se explica a continuación desde la permeabilización en adelante. Para la tinción de cultivos 3D, los ácinos se fijaron en PFA al 4 % durante 20 minutos a 4 °C, se permeabilizaron con Triton™-X100 al 0,5 % en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron en PBS-glicina y después se bloquearon con suero de cabra normal al 10 % durante 1 hora a 37 °C, antes de realizar la tinción por inmunofluorescencia.

La puntuación de los niveles de P-HER2 se explica en la FIG. 10A. Para la puntuación de CK8/18 y SMA en los conductos de la glándula mamaria, se evaluaron 20 campos de bajo aumento por animal para la expresión de CK8/18 como negativa (0), baja (1) o alta (2) y lo mismo para SMA y la suma de las dos puntuaciones se consideró como la puntuación final (de 0 a 4).

Microscopia: Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Nikon Eclipse TS100, un microscopio multifotónico Leica DM5500 o confocal Leica SP5.

Detección de muerte celular in situ mediante TUNEL: Los niveles de apoptosis se evaluaron utilizando el kit de detección de muerte celular *in situ*, AP (Roche, Basilea, Suiza). Se desparafinaron las secciones de tumores en parafina, se rehidrataron y permeabilizaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) TRITON™-X100 al 0,2 % durante 8 minutos. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron y se bloquearon en suero de cabra normal al 20 % durante 1 hora a 37 °C. Después, se añadió la mezcla de reacción TUNEL y se dejó reposar durante 1 hora a 37 °C. La reacción se detuvo incubando con Tampón I (cloruro de sodio 0,3 M, citrato de sodio 30 mM). A continuación, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo anti-fluoresceína-AP durante 30 minutos a 37 °C. Después de tres lavados en solución salina tamponada con Tris (TBS), los portaobjetos se incubaron en sustrato de fosfatasa alcalina en TWEEN™-20 al 0,1 % durante 20 min a temperatura ambiente. Por último, los portaobjetos se montaron utilizando un medio de montaje acuoso. El porcentaje de células TUNEL positivas se calculó utilizando el programa informático Image J (NIH).

Análisis de inmunotransferencia: Las células se sometieron a lisis en tampón RIPA y las proteínas se analizaron mediante inmunotransferencia como se ha descrito anteriormente (Ranganathan et al., "Functional Coupling of p38-Induced Up-Regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells", *Cancer Res.* 66:1702-1711 (2006)). Las membranas se transfirieron utilizando los siguientes anticuerpos adicionales: P-PERK (T982) (Tenkerian et al., "mTORC2 Balances AKT Activation and eIF2alpha Serine 51 Phosphorylation to Promote Survival Under Stress", *Mol. Cancer Res.* 13:1377-1388 (2015)), PERK (Santa Cruz, Dallas, TX), P-EGFR (Y1148), EGFR, P-AKT (S473), P-S6 (S235/236) (Cell signaling, Danvers, MA), GAPDH (Millipore, Darmstadt, Alemania) y β -tubulina (Abcam, Cambridge, MA). Para la inducción del estrés del RE, células MCF10A-HER2 se sembraron en placas de baja adhesión durante 24 horas antes de su recogida.

Ensayo de biotilación y endocitosis de la superficie celular: Para la biotilación de la superficie celular, se utilizó el kit de aislamiento de proteínas de la superficie celular Pierce siguiendo las instrucciones del fabricante con pequeños cambios. En resumen, las células MCF10A-HER2 se privaron de suero y EGF y se trataron con +/-LY4 durante 24 horas antes de estimularse con +/-EGF (100 ng/ml) durante 20'. Posteriormente, las células se lavaron con PBS enfriado con hielo y las proteínas de la superficie se biotinilaron durante 30 minutos a 4 °C. Después de la inactivación, las células se recogieron y se sometieron a lisis usando tampón RIPA. Los lisados de proteínas se incubaron con perlas de agarosa NeutrAvidin y las proteínas unidas se liberaron mediante incubación con tampón de muestra SDS-PAGE que contenía DTT (50 mM). Para los ensayos de endocitosis (Cihil et al., "The Cell-Based L-Glutathione Protection Assays to Study Endocytosis and Recycling of Plasma Membrane Proteins", *J. Vis. Exp.* e50867 (2013)), las células se trataron de manera similar, pero antes del tratamiento con EGF, se biotinilaron las proteínas de la superficie celular. Después de 20 minutos de incubación +/- EGF (100 ng/ml) a 37 °C (para inducir la endocitosis), las células se lavaron con PBS enfriado con hielo y se incubaron con tampón de extracción (para retirar la biotilación de la superficie celular: NaCl 75 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 0,1 mM, glutatión 50 mM y NaOH 80 mM, pH 8,6) durante 30'. Para controlar la eficacia de la extracción, las células se extrajeron sin incubación a 37 °C (t=0). Los lisados celulares se prepararon y procesaron para el aislamiento de proteínas biotiniladas como se ha descrito anteriormente.

Análisis de expresión génica dirigido a células individuales: Los tumores primarios de hembras MMTV-neu de 28 a 30 semanas de vida, se digirieron con collagenasa en una suspensión de células individuales. Los pulmones de hembras MMTV-neu de 15 a 30 semanas de vida se digirieron en una suspensión de células individuales con collagenasa y se resuspendieron en tampón FACS. Después, las células se tiñeron con anti-HER2-PE, anti-CD45-APC y DAPI y la población de células HER2+/CD45- se clasificó usando un clasificador BDFACSAria. Las células clasificadas se resuspendieron en medio a una concentración de 312.500 células/ml y se mezclaron 80 μ l con 20 μ l de reactivo de suspensión (C1 Fluidigm). Para la separación de células individuales, se utilizó un CFI (circuito fluido integrado) C1 para la preamplificación de células individuales de 10-17 μ m. La preamplificación se realizó utilizando el kit Ambion Single Cell-to-CT qRT-PCR y ensayos FAM-MGB de expresión génica TaqMan 20x. El ADNc resultante se diluyó adicionalmente en reactivo de dilución de ADN C1 1/3 y se utilizó para el análisis de expresión génica utilizando el controlador 96.96 IFCs (Fluidigm), Juno System y Biomark HD para la qPCR (PCR cuantitativa) de alto rendimiento. Se utilizó la mezcla maestra TaqMan Fast Advanced para las reacciones de qPCR. El análisis se realizó utilizando el

programa informático de análisis de PCR en tiempo real Fluidigm y la herramienta en línea Clustergrammer (Fernandez et al., "Clustergrammer, A Web-Based Heatmap Visualization and Analysis Tool for High-Dimensional Biological Data", Sci. Data 4:1-12 (2017)) para representar la matriz cromática de la agrupación jerárquica.

5 *Ensayos bioquímicos:* El dominio catalítico EIF2AK3 (PERK) humano recombinante (aminoácidos 536-1116; n.º de cat. PV5107), el sustrato GFP-eIF2 α (n.º de cat. PV4809) y el anticuerpo fosfo-eIF2 α marcado con terbio (n.º de cat. PR8956B), se adquirieron en Invitrogen (Carlsbad, CA). El dominio catalítico HIS-SUMO-GCN2 (aminoácidos 584-1019) se expresó y purificó de *E. coli*. Los ensayos de TR-FRET cinasa se realizaron en ausencia o presencia de inhibidores en un tampón de reacción que consistía en HEPES 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, EGTA 1,0 mM y Brij-35
10 al 0,01 % y sustrato GFP-eIF2 α 100-200 nM. Los ensayos de PERK contenían 62,5 ng/ml de enzima y 1,5 μ M de ATP ($K_{m, app}$ ~1,5 μ M) y los ensayos de GCN2 contenían enzima 3 nM y ATP 90 μ M ($K_{m, app}$ ~200 μ M). Después de la adición del compuesto de ensayo, la reacción se inició mediante la adición de enzima y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de EDTA a una concentración final de 10 mM y se añadió el anticuerpo fosfo-eIF2 α marcado con terbio a una concentración final de 2 nM y se incubó durante 90 minutos.
15 La fluorescencia resultante se monitorizó en un lector EnVision® Multilabel (PerkinElmer, Waltham, MA). La proporciones entre TR-FRET y los valores de Cl_{50} resultantes se determinaron a partir de las curvas de inhibición ajustadas. El perfil de especificidad bioquímico se realizó en Cerep (Redmond, WA) y DiscoverX (San Diego, CA).

Ensayo TR-FRET basado en células: En resumen, se sembraron células 293 GripTite™ (Invitrogen) que expresaban GFP-eIF2 α a razón de 10.000 células por pocillo en placas de 384 pocillos y se dejaron unir durante la noche. Las células se trataron previamente con compuestos de ensayo durante 1 hora. Se añadió tunicamicina (1 μ M) para inducir la actividad PERK y las placas se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Se eliminó el medio de cultivo y las células se sometieron a lisis en un tampón que consistía en Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NP-40 al 1 %, NaF 5 mM, inhibidores de proteasa (Sigma n.º de cat. P8340), inhibidores de fosfatasa (Sigma n.º de cat. P2850) y anticuerpo anti-fosfo-eIF2 marcado con terbio 2 nM (Invitrogen n.º de cat. PM43121). Los lisados celulares se incubaron durante 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente y la fluorescencia se monitorizó en un lector EnVision® Multilabel (PerkinElmer, Waltham, MA). Las proporciones entre TR-FRET y los valores de Cl_{50} resultantes se determinaron a partir de las curvas de inhibición ajustadas utilizando como control pocillos no inducidos (100 % de inhibición) e inducidos (0 % de inhibición).
20
25
30

Ensayo ATF4-luc: se transdujeron células 293 con un lentivirus que expresaba ATF4-luc (SABiosciences, Frederick, MD) y se seleccionaron en medio de crecimiento que contenía puromicina 1 μ g/ml. Para determinar el efecto de los compuestos sobre la actividad de ATF4 inducida por el estrés del RE, se sembraron células 293-ATF4-luc a razón de 15.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina y se dejaron unir durante la noche. Después, las células se pretrataron con compuestos de ensayo durante 30 minutos. Se añadió tunicamicina (2 μ M) para inducir estrés en el RE y las placas se incubaron a 37 °C durante 6 horas. Después, se aspiró el medio de cultivo y las células se sometieron a lisis en tampón de lisis pasiva (Promega n.º de cat. E194A) en un agitador de placas durante 5 minutos. La actividad de luciferasa se monitorizó utilizando el reactivo de ensayo Luciferasa (Promega n.º de cat. E1501) en un contador Wallac 1420 Victor2™ Multilabel (PerkinElmer, Waltham, MA) y los valores de Cl_{50} se determinaron a partir de las curvas de inhibición ajustadas resultantes utilizando como controles pocillos no inducidos (100 % de inhibición) e inducidos (0 % de inhibición).
35
40

Ensayos de viabilidad celular: en placas de 96 pocillos, se monitorizó el crecimiento de células Hela, HT-1080 y Bx-PC-3, en ausencia o presencia de inhibidores de PERK durante 48, 72 o 96 horas, respectivamente. La viabilidad celular se determinó utilizando reactivo CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI) y los valores de Cl_{50} se determinaron a partir de las curvas de inhibición ajustadas resultantes utilizando como control pocillos no tratados (0 % de inhibición) y tratados con estaurosporina 20 μ M (100 % de inhibición).
45

Análisis estadístico: Todos los puntos representan muestras biológicas independientes, representando las barras de error desviaciones estándar y la significación estadística se determinó mediante una prueba de Mann-Whitney utilizando el programa informático Graph Pad Prism.
50

Ejemplo 2 - Las CTD HER2⁺ inactivas presentan una respuesta al estrés del RE

55 Se ha demostrado que la activación de la vía de PERK actúa como un efector crucial de la detención del crecimiento inducida por la RPD y de la supervivencia relacionada con un fenotipo inactivo (Brewer et al., "PERK Mediates Cell-Cycle Exit During the Mammalian Unfolded Protein Response", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:12625-30 (2000); Ranganathan et al., "Dual Function of Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase in Tumor Cell Growth Arrest and Survival", Cancer Res. 68:3260-3268 (2008); y Ranganathan et al., "Functional Coupling of p38-Induced Up-Regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells", Cancer Res. 66:1702-1711 (2006)). En animales MMTV-HER2 un alto porcentaje de ratones desarrolla metástasis en los pulmones, que puede iniciarse mediante CCD tempranas o CCD tardías (Guy et al., "Expression of the Neu Protooncogene in the Mammary Epithelium of Transgenic Mice Induces Metastatic Disease", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10578-10582 (1992); Husemann et al., "Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer", Cancer Cell 13:58-68 (2008); Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2⁺ Mammary Cancer", Nature 540:588-592 (2016); Hosseini et al., "Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast
60
65

Cancer", Nature 540:552-558 (2016)). Las CCD inactivas presentan pérdida de E-cadherina y expresión de Twist1 (Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer", Nature 540:588-592 (2016)) y las CCD negativas a E-cadherina en modelos de cáncer de páncreas, también demostraron ser inactivas y presentaron regulación positiva de CHOP, un gen inducido por PERK (Pommier et al., "Unresolved Endoplasmic Reticulum Stress Engenders Immune-Resistant, Latent Pancreatic Cancer Metastases", Science 360(6394):eaao4908 (2018)). Para evaluar si esta misma correlación entre los niveles de activación de la vía de PERK y la detención del ciclo celular estaba presente en el modelo de metástasis espontánea MMTV-HER2, se utilizaron dos enfoques diferentes - imágenes de alta resolución mediante inmunofluorescencia (IF) y análisis de expresión génica con resolución unicelular de CCD y metástasis. Se realizó IF de secciones de tejido pulmonar MMTV-HER2 de animales portadores de tumores grandes y, por lo tanto, portadores de CCD latentes y proliferativas (Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer", Nature 540:588-592 (2016)). A continuación, los tejidos se tiñeron conjuntamente para detectar CCD positivas para HER2, Ki67 (como marcador de proliferación) y GADD34 (o PPP1r15A). GADD34 es un gen de estrés inducible por PERK responsable del cambio programado de la represión traslacional (debido a la fosforilación de eIF2 α) a la expresión génica inducida por estrés (Novoa et al., "Stress-Induced Gene Expression Requires Programmed Recovery from Translational Repression", EMBO J. 22:1180-7 (2003)). El análisis de imágenes mostró que las lesiones metastásicas HER2⁺ o las CCD con un índice proliferativo bajo (ki67^{bajo}) presentaron altos niveles de estrés del RE como lo muestran los altos niveles de expresión de GADD34 (FIG. 1A, paneles superiores y gráfico). Por otro lado, las CCD sumamente proliferativas o las lesiones mostraron niveles muy bajos de tinción con GADD34 (FIG. 1A, paneles inferiores y gráfico). Los dos marcadores, Ki67 y GADD34, se anticorrelacionaron en el 100 % de las células, confirmando que la RPD^{alta}, las CCD inactivas y las lesiones metastásicas, se pueden biomarcar mediante la detección de GADD34.

A continuación, se evaluó si estas correlaciones también serían válidas en las lesiones metastásicas de mama humano analizando 17 metástasis de cáncer de mama de diferentes subtipos y fuentes (ganglios linfáticos, pulmón, hígado) (Tabla 5). Las metástasis del cáncer de mama se tiñeron para citoqueratinas con objeto de identificar las lesiones metastásicas, Ki67 y GADD34. Las lesiones metastásicas humanas avanzadas presentaron un patrón de tinción más heterogéneo para ambos marcadores entre diferentes pacientes y entre diferentes áreas de la misma lesión que en el modelo de ratón. Sin embargo, se observó una correlación opuesta entre los niveles de proliferación (Ki67) y la activación del estrés del Re (GADD34), independientemente del tipo de metástasis (FIG. 1B). Este análisis valida los hallazgos en los modelos de ratón y que GADD34 puede ayudar a identificar la RPD^{alta}/células tumorales inactivas en sitios metastásicos.

Tabla 5. Muestras de metástasis de cáncer de mama humano

Paciente	Nombre	Estado del RE	Estado de PR	Estado de HER2	Patología	Muestra con metástasis	Citoqueratinas	Ki67*	GADD34*
5	14850	-	-	+	Carcinoma ductal	Ganglio linfático	+	A	B
4	14851	+	-	+	Carcinoma ductal	Ganglio linfático	+	B	I
7	14852	-	-	+	Carcinoma ductal	Ganglio linfático	+	A	B
8	14853	-	-	+	Carcinoma ductal	Ganglio linfático	+	A	B
6	14854	+	+	+	Carcinoma ductal	Ganglio linfático	+	I	B
1	14855	+	+	+	Carcinoma ductal	Ganglio linfático	+	B	A
3	14856	+	+	+	Carcinoma ductal	Ganglio linfático	+	B	A

(continuación)

Paciente	Nombre	Estado del RE	Estado de PR	Estado de HER2	Patología	Muestra con metástasis	Citoqueratinas	Ki67*	GADD34*
9	14857	+	+	+	Carcinoma ductal	Ganglio linfático	+	A	-
10	14858	-	-	+	Carcinoma ductal	Ganglio linfático	+	I	-
2	14859	+	-	+	Carcinoma ductal	Ganglio linfático	+	B	A
	9876 parte D	+	+	-	Invasivo poco diferenciado	Ganglio linfático	+	B	I
	3603 parte B	+	+	-	Ductal moderadamente diferenciado	Hígado	+	A	B
	879 parte C	-	-	-	No se indica	Hígado	+	A	-
	1645 parte F	-	-	+	Ductal moderadamente diferenciado	Hígado	+	B	A
	1415 parte B	+	+	-	Ductal moderadamente diferenciado	Hígado	-	I	I
	8852 parte A	N/D	N/D	N/D	filoides malignos, sarcomatoide de alto grado	Pared torácica	+	B	B
	943 parte C	+, débil	-	-	Adeno poco diferenciado	Pulmón	+	B	A

*alto (A); bajo (B); intermedio (I)

- 5 Los marcadores de proliferación, la inactividad, la latencia y el estrés del RE, presentes en las células metastásicas, se evaluaron realizando un análisis de expresión génica dirigido a células individuales de CCD, micro-metástasis y macro-metástasis alojadas en pulmones de ratones MMTV-HER2. Los pulmones de hembras MMTV-HER2 se procesaron en suspensiones de células individuales y se clasificaron células HER2⁺/CD45⁻ (FIG. 2A). Después, las células clasificadas se procesaron para la separación de células individuales, la lisis, la RT y la preamplificación,
- 10 usando la tecnología C1 (Fluidigm) como se muestra en la FIG. 2A. Esta canalización permitió el aislamiento y el procesamiento, con alto grado de confianza (IF y confirmación molecular de HER2⁺ unicelular) y calidad, de 255 CCD individuales y de 90 células tumorales primarias y sus grupos correspondientes. A continuación, se utilizó qPCR de alto rendimiento para analizar la expresión de genes de estrés del RE, genes del ciclo celular (tanto activadores como inhibidores) y genes de latencia (Kim et al., "Dormancy Signatures and Metastasis in Estrogen Receptor Positive and
- 15 Negative Breast Cancer", PLoS One 7:e35569 (2012); B'chir et al., "The eIF2 α /ATF4 Pathway is Essential for Stress-Induced Autophagy Gene Expression", Nucleic Acids Res. 41:7683-99 (2013); Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2⁺ Mammary Cancer", Nature 540:588-592 (2016)) (FIG. 2B). La expresión génica de resolución unicelular de las CCD reveló la existencia de una población de células (FIG. 1C, grupo 1, aproximadamente el 19 % de las CTD) que muestra una fuerte regulación positiva y simultánea de todos los genes de
- 20 estrés del RE analizados (incluido el propio PERK) (cuadro que incluye Fam 123b-Ddit3) con reguladores negativos de proliferación celular como Rb1 y TP53 e inhibidores de CDK, p21, p27, p16 y p15 (cuadro que incluye Cdkn2a-

Rb1) (FIG. 1C). El enriquecimiento en la expresión de genes de latencia tales como NR2F1, DEC2 (*Bhlhe41*), TWIST1, CDH5, STAT3 y COL4a5, también se observaron en estas células (Kim et al., "Dormancy Signatures and Metastasis in Estrogen Receptor Positive and Negative Breast Cancer", PLoS One 7:e35569 (2012) y Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer", Nature 540:588-592 (2016)) (cuadro que incluye Nr2f1-Ccnd1). Otro grupo de CCD, el grupo 2 (22 %) también mostró altos niveles de expresión génica de estrés del RE junto con p21. El grupo 3 (6 %) mostró menor estrés del RE, inhibidores del ciclo celular y genes de latencia, lo que sugiere que pudiese tratarse de células en tránsito que salen del estado de latencia o en modo de ciclo lento. En total, alrededor del 40 % de las CCD mostraron un nivel de expresión génica de estrés del RE de alto a intermedio, simultáneo con inhibidores del ciclo celular o genes de latencia. Esto está en el intervalo con el porcentaje de CCD latentes detectado en animales MMTV-HER2 con progresión avanzada usando detección de fosfo-Histona H3 y fosfo-Rb (Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer", Nature 540:588-592 (2016)). En conjunto, estos datos demuestran que, incluso en animales con metástasis detectables, ~40 % de las CCD presentan alta expresión de inhibidores del ciclo celular. De manera importante, en este modelo, esta subpoblación de CCD latentes presenta una RPD no resuelta con una expresión de activación notable de los genes de la vía de PERK.

Ejemplo 3 - la inhibición de PERK erradica las CCD inactivas en la médula ósea y en los pulmones y, a su vez, suprime la metástasis pulmonar

Los resultados de los ejemplos anteriores dieron lugar a una evaluación sobre los efectos de los inhibidores selectivos de PERK acerca del destino de las CCD latentes y la formación de metástasis. LY2, LY3 y LY4 (inhibidores de la serie LY) se han identificado como inhibidores fuertes y selectivos de PERK con propiedades similares a las de los fármacos apropiadas para corroborar estudios *in vivo* (Pytel et al., "PERK Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor: Gene Dose Determines Tumor-Suppressive Versus Tumor Promoting Properties of PERK in Melanoma", PLoS Genet. 12:1-22 (2016)). Los inhibidores de la serie LY se probaron en ensayos de cinasa *in vitro* (utilizando eIF2 α como sustrato) y en ensayos basados en células que analizan la fosforilación de eIF2 α y su producción de ATF4 cadena abajo (Tabla 6). Los tres inhibidores mostraron una fuerza similar o superior en comparación con GSK2656157 (Axten et al., "Discovery of GSK2656157: An Optimized PERK Inhibitor Selected for Preclinical Development", ACS Med. Chem. Lett. 4:964-968 (2013)); disminuyeron de manera eficaz los niveles de P-PERK (P-T980) y su diana ATF4 secuencia abajo en células MCF10A que expresan HER2 (FIG. 2C y FIG. 3A); y volvieron sensibles a estas mismas células al tratamiento con dosis bajas de taspargina, mostrando así cómo estos inhibidores de PERK afectan selectivamente a la adaptación al estrés del RE (FIG. 2D).

Utilizando ensayos enzimáticos bioquímicos (FIG. 2E), LY4 mostró la mayor especificidad al no presentar dianas de cinasa secundaria por debajo de una concentración de 15 μ M, aunque LY2, LY3 y GSK2656157, presentaron diversas dianas secundarias por debajo de 5 μ M, e incluso a una concentración de 1 μ M. Utilizando el perfilado de cinasas DicoveRx scanMAX™ (Tabla 6), se corroboró que LY4 presentaba mayor selectividad en comparación con los otros inhibidores, incluso a una concentración muy alta (20 μ M), en la que LY4 inhibió sólo 20 cinasas en >50 % de un total de 456 en comparación con 80 por GSK2656157, u 8 en comparación con 58 en >60 % de inhibición. Ninguna de estas dianas secundarias resultó ser ninguna de las otras cinasas conocidas eIF2 α , EIF2AK1 (también conocida como HRI), EIF2AK2 (también conocida como PKR) y EIF2AK4 (también conocida como GCN2) (Tabla 7), lo que indica que la actividad medida en eIF2 α fue sumamente específica de la inhibición de PERK.

Tabla 6. Valores de CI₅₀ enzimáticos y basados en células y selectividad de cinasa de los diferentes inhibidores de PERK

Compuesto	Valor de CI ₅₀ enzimático de PERK ^a (μ M)	Valor de CI ₅₀ basado en células de PERK ^b (μ M)	Valor de CI ₅₀ basado en células de ATF4-luc ^c (μ M)	Valor de CI ₅₀ enzimático de GCN2 ^d (μ M)	n.º de cinasas inhibidas > 50 % ^e		
					0,2 μ M	2,0 μ M	20,0 μ M
LY2	0,002	0,117	0,056	10,8	16	35	138
LY3	0,002	0,026	0,016	16,4	27	85	229
LY4	0,002	0,054	0,048	18,1	19	20	48
GSK2656157 ^f	0,008	0,036	0,021	>200	34	80	183

^a Ensayo bioquímico PERK utilizando eIF2 α purificado como sustrato.

^b Ensayo basado en células de fosforilación de eIF2 α inducida por tunicamicina en células 293.

^c Ensayo basado en células de actividad de ATF4-Luc inducida por tunicamicina en células 293.

^d Ensayo bioquímico de GCN2 utilizando eIF2 α purificado como sustrato.

^e Perfilado de cinasas con DicoveRx scanMAX™ basado en datos de unión usando desplazamiento de sondas del sitio activo, se analizaron 456 cinasas.

^f Atkins et al., "Characterization of a Novel PERK Kinase Inhibitor with Antitumor and Antiangiogenic Activity", Cancer Res. 73(6): 1993-2002 (2013).

Tabla 7. Comparación de inhibición *in vitro* de otras cinasas eIF2α

Símbolo del GEN de KINOMEScan ^a	Símbolo del gen de Entrez	LY4			GSK-2656157 ^b		
		0,2 μM	2 μM	20 μM	0,2 μM	2 μM	20 μM
EIF2AK1	EIF2AK1	0	0	35	8	77	95
PRKR	EIF2AK2	0	0	0	20	45	67
GCN2(Kin.Dom.2,S808G)	EIF2AK4	0	0	28	7	13	79
^a Perfilado de cinasas con DiscoverX scanMAX™ basado en datos de unión usando desplazamiento de sondas del sitio activo, se analizaron 456 cinasas. ^b Atkins et al., "Characterization of a Novel PERK Kinase Inhibitor with Antitumor and Antiangiogenic Activity", Cancer Res. 73(6): 1993-2002 (2013).							

Se trataron ratones hembra MMTV-HER2 uníparos de 24 a 32 semanas de vida con vehículo o LY4 (50 mpk) i.p. diariamente, durante dos semanas. Las glándulas mamarias, los pulmones, el páncreas, la médula ósea y los tumores, se extirparon para análisis adicionales. LY4 se toleró bien, sin cambios significativos en el peso corporal, lo que concuerda con estudios recientes que no muestran ningún efecto sobre los niveles de glucosa en sangre o la función del páncreas (Pytel et al., "PERK Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor: Gene Dose Determines Tumor-Suppressive Versus Tumor Promoting Properties of PERK in Melanoma", PLoS Genet. 12:1-22 (2016)). El inhibidor no tuvo un efecto significativo sobre la homeostasis de las células de la médula ósea ni sobre los glóbulos blancos de la sangre periférica, como lo demuestra la falta de efecto sobre los recuentos celulares totales de hembras MMTV-HER2 (FIG. 2F).

La inhibición de PERK provocó una disminución significativa de los niveles de P-PERK y P-eIF2α en los conductos de la glándula mamaria y en el tejido pancreático (aunque sólo parcial, especialmente en los islotes pancreáticos) (FIG. 3B). Se concluyó que el suministro sistémico de LY4 inhibe eficazmente la activación de PERK y la fosforilación de eIF2α. La inhibición de PERK no redujo completamente la actividad de PERK, lo que puede permitir a los ratones controlar su función pancreática y sus niveles de glucosa (Yu et al., "Type I Interferons Mediate Pancreatic Toxicities of PERK Inhibition", Proc. Natl. Acad. Sci. 112:15420-15425 (2015)).

Un alto porcentaje de animales MMTV-HER2 desarrollan metástasis en los pulmones, que puede iniciarse en una etapa temprana de la progresión (Guy et al., "Expression of the Neu Protooncogene in the Mammary Epithelium of Transgenic Mice Induces Metastatic Disease", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10578-10582 (1992); Husemann et al., "Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer", Cancer Cell 13:58-68 (2008); Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer", Nature 540:588-592 (2016); Hosseini et al., "Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast Cancer", Nature 540:552-558 (2016); Linde et al., "Macrophages Orchestrate Breast Cancer Early Dissemination and Metastasis", Nat. Commun. 9:21 (2018)).

Por tanto, se monitorizó el efecto del inhibidor de PERK, LY4, sobre la enfermedad metastásica en animales con tumores pequeños y/o grandes, palpables. Todos los animales tratados con vehículo presentaron metástasis detectables en secciones teñidas con H&E. Las lesiones que presentaban >100 células se clasificaron como macro-metástasis ya que también suelen ser positivas para marcadores de proliferación (FIG. 1A). La cuantificación de macro-metástasis por animal (5 secciones pulmonares no consecutivas) reveló que, después de sólo dos semanas de tratamiento, LY4 redujo el número y la incidencia de macro-metástasis (FIG. 3C) sin afectar el área de estas metástasis (FIG. 4A). Esto sugirió que la inhibición de PERK podría estar actuando en las etapas iniciales de la metástasis en lugar de reducir las macro-metástasis establecidas. Por tanto, a continuación se evaluó si el tratamiento con LY4 pudiese estar afectando a la intravasación de células tumorales desde el sitio primario o a la transición de CCD solitarias a micro-metástasis (que contienen entre 2 y 100 células). La detección de células tumorales circulantes (CTC) HER2+ directamente en muestras de sangre no mostró diferencias significativas entre los animales tratados con vehículo y los tratados con LY4 (FIG. 4B), lo que indica que LY4 no está afectando extremadamente a la intravasación de células tumorales. Por otro lado, la detección de micro-metástasis y de CCD individuales utilizando la detección de HER2 mediante IHQ reveló una disminución significativa en el número de micro-metástasis en hembras tratadas con LY4 (FIG. 3D). Más del 80 % de las CCD individuales en los pulmones son negativas para P-Rb, lo que indica que en su mayoría están fuera de ciclo y en estado de latencia. Esta medición reproduce mediciones de estudios anteriores (Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer", Nature 540:588-592 (2016)). De manera significativa, LY4 redujo fuertemente la cantidad de CCD individuales no proliferativas (negativas a P-Rb) que se asocian comúnmente a vasos sanguíneos en secciones de pulmón, sin afectar a la cantidad de CTD solitarias positivas a P-Rb (FIG. 3E) o micro-metástasis (FIG. 4C). De manera importante, LY4 disminuyó significativamente la cantidad de CCD encontradas en la médula ósea (FIG. 3F). En este órgano, las metástasis nunca se desarrollan, pero las CCD se encuentran a una alta incidencia y están latentes (Bragado et al., "TGF-Beta2 Dictates Disseminate Tumor Cell Fate in Target Organs Through TGF-Beta-RIII and P38Alpha/Beta Signalling", Nat. Cell. Biol. 15:1351-1361 (2013); Husemann et al., "Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer", Cancer Cell 13:58-68 (2008); y Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer", Nature 540:588-592 (2016)). Estos resultados sostienen que la inhibición de PERK se dirige selectivamente a las CCD

latentes no proliferativas que presentan señalización activa de PERK y RPD.

Para seguir comprobando si el tratamiento con LY4 podría dirigirse selectivamente a la supervivencia de las CCD humanas fuera de ciclo, esta biología se modeló en cultivos 3D. Se utilizaron células humanas ZR75.1 HER2⁺ que expresaban de forma estable una proteína fluorescente fotoconmutable (Dendra2) fusionada a histona H2B para realizar ensayos de retención de etiqueta de larga duración, debido al lento recambio de nucleosomas que contienen H2B en células inactivas (Wilson et al., "Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch From Dormancy to Self-Renewal During Homeostasis and Repair", Cell 135:1118-1129 (2008)). Tras una exposición lumínica de 405 nm durante aproximadamente 1 minuto, la proteína H2B-DENDRA2 cambia de fluorescencia verde a roja y se vuelve doblemente positiva a verde y rojo; las células que vuelven al verde se han dividido y diluido las moléculas H2B-DENDRA2-ROJO mientras que las células inactivas siguen siendo H2B-DENDRA2 VERDE y ROJO (Gurskaya et al., "Engineering of a Monomeric Green-to-Red Photoactivatable Fluorescent Protein Induced by Blue Light", Nat. Biotechnol. 24:461-465 (2006)). Las células sembradas en matriz de Matrigel 3D a alta densidad (grupos) para imitar macro-metástasis o a baja densidad (células individuales) para imitar a las CCD individuales, se fotoconvirtieron (100 %) (FIG. 4D). Ocho días más tarde, sólo el 35 % de las células de alta densidad eran positivas a H2B-DENDRA2-ROJO. En cambio, el 65 % de las células ZR75.1 HER2⁺ de baja densidad eran positivas a H2B-DENDRA2-ROJO (FIG. 4E), imitando el estado inactivo de las CCD solitarias (Bragado et al., "TGF-Beta2 Dictates Disseminate Tumor Cell Fate in Target Organs Through TGF-Beta-RIII and P38Alpha/Beta Signaling", Nat. Cell. Biol. 15:1351-1361 (2013)). El tratamiento con el inhibidor de PERK, LY4, no tuvo ningún efecto significativo sobre la viabilidad de ZR75.1 HER2⁺ sembrado a alta densidad (FIG. 4F). Sin embargo, erradicó las células ZR75.1 HER2⁺ individuales inactivas, en paralelo a los resultados de las CCD *in vitro* (FIG. 3G). Estos datos indican que las señales intrínsecas y/o dependientes de la MEC en el contexto de células tumorales solitarias causan una dependencia de la señalización de PERK y que LY4 de hecho se dirige selectivamente a las CCD de ciclo lento o no proliferativas que posteriormente se reactivan para producir metástasis.

Ejemplo 4 - la inhibición de PERK bloquea la progresión temprana y tardía del tumor mamario impulsada por HER2

Habiendo demostrado que existe una dependencia sobre PERK en las CCD inactivas con RPD^{alta}, donde la latencia es más relevante, a continuación se evaluaron las lesiones tumorales. Se descubrió que la progresión impulsada por HER2 era genéticamente dependiente de PERK cinasa en el modelo MMTV-HER2 (Bobrovnikova-Marjon et al., "PERK-Dependent Regulation of Lipogenesis During Mouse Mammary Gland Development and Adipocyte Differentiation", Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 105:16314-16319 (2008)) y se había demostrado que los tumores HER2⁺ eran sensibles a la proteotoxicidad y dependientes de ERAD (Singh et al., "HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive", Sci. Signal. 8:ra52 (2015)). Asimismo, el análisis de la base de datos cBio (Cerami et al., "The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data", Cancer Discovery 2:401-404 (2012)) mostró que -14 % de los tumores de mama humanos amplificados por HER2 presentaban regulación positiva del ARNm para PERK (FIG. 5A). Por tanto, se investigó si LY4 afectaba a la progresión del tumor de mama inducida por HER2 en lesiones primarias en las que se pueden diseccionar los diferentes estadios de progresión desde glándulas mamarias hiperplásicas hasta CDIS y cáncer invasivo (Lu et al., "Mechanism of Inhibition of MMTV-neu and MMTV-wnt1 Oncogenesis mamaria inducida por el agonista RARalpha AM580", Oncogene 29(25):3665-76 (2010); Muller et al., "Single-Step Induction of Mammary Adenocarcinoma in Transgenic Mice Bearing the Activated c-neu Oncogene", Cell 54(1):105-115 (1988); Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer", Nature 540:588-592 (2016); Hosseini et al., "Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast Cancer", Nature 540:552-558 (2016)).

El análisis de glándulas mamarias de hembras uníparas de 24 semanas de vida mostró que los animales MMTV-HER2 tratados con vehículo exhibían conductos con ramificaciones densas secundarias y terciarias (FIG. 6A, paneles de la izquierda), y el análisis histológico mostró frecuentes lesiones hiperplásicas mamarias (FIG. 6A, paneles de la derecha, flechas negras). En cambio, los animales tratados con LY4 mostraron una arquitectura glandular "normalizada" con ramificaciones menos densas, parecidas a las del árbol mamario de ratones FVB normales no transgénicos (FIG. 3B). Los animales tratados con LY4 también mostraron un aumento drástico del número de conductos de glándula mamaria con lumen hueco, constituyendo más del 60 % de las estructuras en comparación con alrededor del 20 % en las hembras de control (FIG. 6B y FIG. 5C). En comparación con los animales tratados con vehículo, el número de hiperplasias ocluidas y lesiones similares a CDIS, también se redujo a menos de la mitad. Las lesiones hiperplásicas de los animales HER2⁺ de control mostraron diversos grados de diferenciación luminal, según lo evaluado por los niveles desiguales de expresión de citoqueratina 8/18 (FIG. 6C, panel superior). Las células mioepiteliales (detectadas como positivas a actina del músculo liso, AME), de lo contrario, igualmente separadas en los conductos de animales FVB normales, se distribuyeron de manera desigual en las hiperplasias tratadas con vehículo en los ratones MMTV-HER2. En cambio, los animales MMTV-HER2 tratados con LY4 presentaron una mayor expresión de citoqueratina 8/18 en la capa luminal, frecuentemente rodeando un lumen vacío, y una capa continua externa de células mioepiteliales (FIG. 6C, panel inferior y gráfico). Estos datos indican que el tratamiento con LY4 conduce a una "normalización" de las lesiones tempranas del cáncer a través de un mecanismo que parece restablecer los programas de diferenciación.

Durante dos semanas, los animales se trataron con LY4 (FIG. 7A) una vez que presentaron los tumores, con un

volumen que variaba de 30 a 200 mm³ (dos tumores eran >200 mm³). En el grupo de tratamiento con vehículo, los tumores crecieron de manera constante (FIG. 8A), alcanzando hasta 10 veces su volumen original en dos semanas (FIG. 7B, gráfico superior). En cambio, los tumores tratados con LY4 mostraron una tasa de crecimiento reducida (FIG. 8A), permaneciendo algunos tumores en citostasis completa (definida como la duplicación del volumen tumoral una sola vez en el período de 2 semanas, 43 % en los tratados con LY4 frente al 7 % en los controles) (FIG. 7B, gráfico inferior) y algunos tumores (25 %) mostraron regresión en el tratamiento de la ventana de 2 semanas (FIG. 7C). Esto condujo a una disminución significativa en el volumen tumoral final medio (FIG. 8B). Si bien los niveles de proliferación (P-histona H3 IHQ) no fueron diferentes entre los tumores tratados con vehículo y con LY4 (FIG. 7D), la tinción TUNEL de secciones tumorales mostró un aumento significativo en los niveles de fragmentación de ADN presentes en los animales tratados con LY4 (FIG. 8C). Por tanto, en más lesiones primarias, el tratamiento con LY4 indujo la apoptosis de tumores HER2⁺ establecidos, argumentando que durante la progresión las funciones de PERK promueven la idoneidad dependiente del contexto.

El tratamiento con LY4 de células cancerosas humanas con sobreexpresión de HER2 (MCF10A-HER2 o ZR75.1) o con amplificación de HER2 (SKBR3) (FIG. 8D y FIG. 7E) en cultivos de ácidos 3D en Matrigel mostró que un tratamiento de 10 días con vehículo o con LY4 (2 µM) aumentaba significativamente los niveles de apoptosis (caspasa 3 escindida) en estos organoides, especialmente en la masa celular interna que está privada de contacto con la MEC (FIG. 8D). Al igual que *in vivo*, no se observó ningún cambio significativo en los niveles de proliferación detectados por los niveles de fosfo-histona H3 (FIG. 7F). Se concluyó que, en la organización epitelial ductal, las lesiones tempranas MMTV-HER2⁺ requieren PERK para las alteraciones impulsadas por HER2. En las células cancerosas humanas HER2⁺ y en los tumores de ratón, HER2 depende de PERK para sobrevivir.

Ejemplo 5 - La señalización de PERK es necesaria para la fosforilación y localización óptimas de HER2 y para la activación de AKT y ERK

Dado que los tumores HER2⁺ son sensibles a la proteotoxicidad (Singh et al., "HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive", *Sci. Signal.* 8:ra52 (2015)), se evaluó si los inhibidores de PERK podrían afectar a la actividad óptima de HER2 debido al aumento de la carga de proteínas cliente del RE. La detección de la fosforilación de HER2 en los tumores, en los restos Y1221/1222, mostró que el área positiva para P-HER2 comunicada por otros autores (DiGiovanna et al., "Active Signaling by Neu in Transgenic Mice", *Oncogene* 17:1877-1884 (1998)) se solapaba con la tinción de P-PERK y P-eIF2α (FIG. 9A). Este hallazgo indicó que la activación de las vías de PERK y HER2 co-localiza. De manera similar, el perfilado de expresión génica dirigida a células individuales de células tumorales primarias también mostró una población de células tumorales primarias (alrededor del 25 %) con altos niveles de expresión de genes de estrés del RE (FIG. 9B), que podrían corresponder a las que muestran activación de P-HER2. De manera importante, cuando se puntuaron los niveles de P-HER2 en los tumores, teniendo en cuenta tanto el área como la intensidad de la tinción (FIG. 10A), se descubrió que, en comparación con los animales de control (FIG. 9C), los tumores tratados con LY4 mostraban niveles significativamente más bajos de P-HER2. HER2 señala como un homodímero o heterodímero con EGFR y HER3 (Moasser MM, "The Oncogene HER2: Its Signaling and Transforming Functions and its Role in Human Cancer Pathogenesis", *Oncogene* 26(45):6469-87 (2007) y Negro et al., "Essential Roles of Her2/erbB2 in Cardiac Development and Function", *Recent Prog. Horm. Res.* 59:1-12 (2014)). El tratamiento *in vitro* de células MCF10A-HER2 que se privaron de suero y se trataron con EGF (100 ng/ml, 15 minutos) en presencia o ausencia de LY4 (2 µM) reveló que el inhibidor de PERK disminuía los niveles tanto iniciales como inducidos por EGF de P-EGFR y P-HER2, junto con la regulación negativa de los niveles de la vía de supervivencia de P-AKT, P-S6 y P-ERK1/2 (FIG. 9D y gráfico y FIG. 10B). No se observó ningún efecto obvio en estas condiciones sobre los niveles totales de HER2 o la heterodimerización con EGFR según lo determinado por estudios de biotinilación y co-inmunoprecipitación en la superficie. Dado que LY4 no tiene un efecto inhibitorio directo sobre el sitio activo de ninguno de los miembros de la familia HER, AKT o S6 cinasas (Tabla 8), este efecto ha de deberse a un efecto indirecto de la inhibición de PERK sobre la señalización de HER2. A diferencia de otros miembros de la familia de HER, se sabe que HER2 permanece en la membrana plasmática después de la unión al ligando y su dimerización (Hommelgaard et al., "Association with Membrane Protrusions Makes ErbB2 an Internalization-Resistant Receptor", *Mol Biol Cell.* 15(4):1557-67 (2004); Bertelsen et al., "The Mysterious Ways of ErbB2/HER2 Trafficking", *Membranes (Basel)* 4:424-446 (2014)). Para probar si LY4 podría estar alterando el mecanismo de activación de los receptores de HER2, se realizaron ensayos de biotinilación de superficie para medir la presencia del receptor en la superficie celular y de biotinilación de superficie reversible para medir la endocitosis del receptor (Cihil et al., "The Cell-Based L-Glutathione Protection Assays to Study Endocytosis and Recycling of Plasma Membrane Proteins", *J. Vis. Exp.* e50867 (2013)). Los datos mostraron que el tratamiento con LY4 disminuyó la cantidad de P-HER2 y HER2 total en la superficie celular (FIG. 9E y FIG. 10C), mientras que simultáneamente aumentaba el fosfo-HER2 endocitosado y el HER2 total (FIG. 9F). Estos datos, junto con los de Singh et al., "HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive", *Sci. Signal.* 8:ra52 (2015), sugieren que la señalización de PERK y la función adecuada de la RPD son necesarias para mantener la señalización descendente adecuada de HER2 al afectar a la localización y activación óptimas del receptor.

Tabla 8. Actividad inhibidora directa de LY4 en la vía de señalización de la familia HER

Símbolo del GEN de KINOMEscan	Símbolo del gen de Entrez	LY4			GSK-2656157		
		0,2 μ M	2 μ M	20 μ M	0,2 μ M	2 μ M	20 μ M
AKT1	AKT1	0	5	0	14	32	0
AKT2	AKT2	0	0	0	0	4	8
AKT3	AKT3	0	0	13	24	3	0
EGFR	EGFR	30	23	16	18	16	50
ERBB2	ERBB2	0	0	0	57	64	97
ERBB3	ERBB3	0	0	0	40	22	53
ERBB4	ERBB4	0	0	4	0	0	0
ERK1	MAPK3	2	18	0	0	17	0
ERK2	MAPK1	0	0	1	0	0	0
ERK3	MAPK6	0	32	3	0	16	0
ERK4	MAPK4	0	0	0	0	35	0
ERK5	MAPK7	0	0	4	4	23	12
ERK8	MAPK15	0	0	0	0	3	6
S6K1	RPS6KB1	31	0	24	0	30	56
SRC	SRC	0	1	11	10	45	69
SYK	SYK	0	0	0	0	12	23
CSK	CSK	31	0	14	0	33	64
PIK3CA	PIK3CA	9	0	8	0	8	0
PIK3CB	PIK3CB	0	0	12	0	0	0
PIK3CG	PIK3CG	24	0	26	36	47	50
PIK3C2B	PIK3C2B	40	39	94	0	9	22
PYK2	PTK2B	0	0	6	0	0	3

¹Perfilado de cinasas con DiscoverX scanMAX™ basado en datos de unión usando desplazamiento de sondas del sitio activo, se analizaron 456 cinasas.

Ejemplo 6 - La combinación secuencial de un inhibidor de CDK seguida de una inhibición de PERK mejora el efecto antimetastásico de LY4

Se establecieron los efectos de la inhibición farmacológica de PERK en lesiones primarias y, lo que es más importante, también se estableció que LY4 podía inhibir la metástasis mediante la erradicación de CCD latentes. Con esta información, se evaluó si los fármacos clínicamente disponibles, que imitarían la latencia, podrían utilizarse para hacer que las células cancerosas inducidas por latencia tuvieran una RPD^{alta} y fueran sensibles a LY4. Este razonamiento se confirmó con el hallazgo de que las CCD con RPD^{alta} expresaron mayores niveles de inhibidores de CDK (FIG. 1C). Por tanto, a continuación se planteó la cuestión de si el aumento de la reserva de CCD inactivas por encima del 50 % basal mediante el tratamiento previo de los animales con un inhibidor de CDK4/6, Abemaciclib (50 mpk, 4 semanas) (FIG. 11A), mejoraría aún más el efecto antimetastásico de LY4. De hecho, el tratamiento previo de hembras MMTV-HER2 con Abemaciclib en solitario, produjo un aumento sorprendente de células GADD34⁺ en secciones de tumores primarios (FIG. 11B), que por lo demás muestran niveles muy bajos y localizados de tinción con GADD34 (control). La medición en tumores primarios sirvió como biomarcador sustituto de la RPD (respuesta a proteínas desplegadas) asociada a inactividad causada por Abemaciclib. Como se esperaba, el tratamiento con LY4 eliminó la expresión de GADD34 en el tumor primario de los animales tratados (FIG. 11B). El tratamiento secuencial de ratones con Abemaciclib (fase de inducción similar a la latencia) seguido de LY4 (fase de erradicación de CCD latentes) produjo la misma disminución en la carga de macro-metástasis observada con el tratamiento único de LY4 (FIG. 11C). Sin embargo, la combinación eliminó casi por completo la presencia de micro-metástasis (FIG. 11D) y, como se aprecia con el agente único, disminuyó en gran medida el número de células cancerosas diseminadas individuales inactivas

(FIG. 11E). En conjunto, estos resultados confirman la lógica de la combinación secuencial de un agente citostático, tal como un inhibidor de CDK, seguido de LY4, como una estrategia terapéutica prometedora para impedir la metástasis dirigiéndose a las CDD inactivas que reactivan y siembran estas lesiones.

5 Ejemplo 7 - Análisis de los Ejemplos 2-6

Múltiples estudios en modelos de cáncer de mama HER2⁺ han concluido que la tumorigénesis del cáncer de mama HER2⁺ depende de la señalización de PERK para la supervivencia y la adaptación (Bobrovnikova-Marjon et al., "PERK Promotes Cancer Cell Proliferation and Tumor Growth by Limiting Oxidative DNA Damage", *Oncogene* 29(27):3881-95 (2010); Singh et al., "HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive", *Sci. Signal.* 8:ra52 (2015); Avivar-Valderas et al., "PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress Responses to Promote Survival During Extracellular Matrix Detachment", *Mol. Cell. Biol.* 31:3616-3629 (2011); y Avivar-Valderas et al., "Regulation of Autophagy During ECM Detachment is Linked to a Selective Inhibition of mTORC1 by PERK", *Oncogene* 32(41):4932-40 (2013)). Curiosamente, también se ha descubierto que las células tumorales inactivas, que están presentes en los bordes de la cirugía y también como células cancerosas diseminadas latentes en órganos diana (Bragado et al., "TGF-Beta2 Dictates Disseminate Tumor Cell Fate in Target Organs Through TGF-Beta-RIII and P38Alpha/Beta Signalling", *Nat. Cell. Biol.* 15:1351-1361 (2013); Chéry et al., "Characterization of Single Disseminated Prostate Cancer Cells Reveals Tumor Cell Heterogeneity and Identifies Dormancy Associated Pathways", *Oncotarget* 5(20):9939-51 (2014); Sosa et al., "Mechanisms of Disseminated Cancer Cell Dormancy: An Awakening Field", *Nat. Rev. Cancer* 14:611-622 (2014); y Sosa et al., "NR2F1 Controls Tumour Cell Dormancy Via SOX9- and RARbeta-Driven Quiescence Programmes", *Nat. Commun.* 6:6170 (2015)), activan la señalización de PERK para la supervivencia junto con otras vías de estrés del RE (Adomako et al., "Identification of Markers that Functionally Define a Quiescent Multiple Myeloma Cell Sub-Population Surviving Bortezomib Treatment", *BMC Cancer* 15:444 (2015); Ranganathan et al., "Dual Function of Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase in Tumor Cell Growth Arrest and Survival", *Cancer Res.* 68:3260-3268 (2008); Ranganathan et al., "Functional Coupling of p38-Induced Up-Regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells", *Cancer Res.* 66:1702-1711 (2006); Schewe et al., "ATF6alpha-Rheb-mTOR Signaling Promotes Survival of Dormant Tumor Cells *In Vivo*", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:10519-10524 (2008); Schewe et al., "Inhibition of eIF2alpha Dephosphorylation Maximizes Bortezomib Efficiency and Eliminates Quiescent Multiple Myeloma Cells Surviving Proteasome Inhibitor Therapy", *Cancer Res.* 69:1545-1552 (2009); y Chéry et al., "Characterization of Single Disseminated Prostate Cancer Cells Reveals Tumor Cell Heterogeneity and Identifies Dormancy Associated Pathways", *Oncotarget* 5(20):9939-51 (2014)). Recientemente, Pommier et al., "Unresolved Endoplasmic Reticulum Stress Engenders Immune-Resistant, Latent Pancreatic Cancer Metastases", *Science* 360(6394):eaao4908 (2018) () validaron este trabajo al mostrar que las CCD pancreáticas alojadas en hígados (y otros modelos) activan la RPD durante la inactividad. Este nivel de reproducibilidad entre diferentes cánceres y modelos sugiere un alto nivel de relevancia biológica para esta biología.

Los ejemplos del presente documento demuestran que el inhibidor de PERK, LY4, puede dirigir selectivamente la dependencia de HER2 en las CCD y en lesiones primarias. Un hallazgo destacado a comentar es el efecto inhibitorio de LY4 sobre la metástasis. En el modelo MMTV-HER2, como ocurre con los pacientes, la metástasis puede ser asíncrona con el tumor primario y a veces desarrollarse incluso con lesiones primarias ocultas, iniciándose algunas metástasis antes de la detección ostensible del tumor (Husemann et al., "Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer", *Cancer Cell* 13:58-68 (2008); Pavlidis et al., "Cancer of Unknown Primary (CUP)", *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 54:243-250 (2005); Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2⁺ Mammary Cancer", *Nature* 540:588-592 (2016); y Hosseini et al., "Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast Cancer", *Nature* 540:552-558 (2016)). El tratamiento con LY4 redujo todas las metástasis, las iniciadas tempranamente (antes de que los tumores ostensibles fueran obvios) o las metástasis que coincidieron con el crecimiento del tumor primario ostensible (FIG. 8). Esto es importante porque sostiene que el efecto sobre la metástasis no se debió simplemente a la reducción de la carga tumoral primaria causada por LY4. Sorprendentemente, la carga metastásica se redujo con el tratamiento con LY4 al eliminar grupos pequeños o solitarios no proliferativos de CTD negativas a P-Rb. La obtención de imágenes y la qPCR múltiple unicelular revelaron que estas CCD mostraban una regulación positiva más frecuente de GADD34 (proteína) y un conjunto más grande de genes de estrés del RE, incluido el propio PERK, al mismo tiempo que muestra un fenotipo inactivo, revelado por la regulación positiva de varios reguladores negativos de proliferación celular. Debe tenerse en cuenta que parte del programa de estrés del RE inducido por PERK, implica la regulación de la transcripción y que otra parte es la traducción preferencial de genes que contienen ORF (*open reading frame*, marco abierto de lectura) cadena arriba, tales como ATF4 y GADD34 (Young et al., "Upstream Open Reading Frames Differentially Regulate Gene Specific Translation in the Integrated Stress Response", *J. Biol. Chem.* 291:16927-16935 (2016)). De manera similar, se ha demostrado que la detención de G1 inducida por la RPD se produce por la inhibición de la traducción de ciclina D1 (Brewer et al., "Mammalian Unfolded Protein Response Inhibits Cyclin D1 Translation and Cell-Cycle Progression", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:8505-8510 (1999)). Experimentos de organogénesis en 3D utilizando líneas de células cancerosas HER2⁺ humanas, confirmaron la destrucción selectiva por parte de LY4 de células cancerosas individuales inactivas. Estos datos sostienen que es más probable que las CCD inactivas dependan de la señalización PERK para sobrevivir. De manera similar, una subpoblación de células metastásicas humanas de pacientes con cáncer de mama también mostró una correlación negativa entre GADD34 y Ki67, validando la asociación encontrada en ratones. Estos datos sugieren que, junto con NR2F1 (Borgen et al., "NR2F1 Stratifies Dormant Disseminate Tumor Cells in Breast Cancer Patients", *Breast Cancer Research* 20:120 (2018)), GADD34 solo o junto

con NR2F1 puede servir como un conjunto robusto de biomarcadores para las CCD latentes/LTPR^{alta} y, por tanto, guiar la selección de pacientes para el tratamiento.

Descubrir una diana y un fármaco que puedan erradicar las CCD latentes es muy importante porque se sabe que las CCD latentes, evaden las terapias antiproliferativas a través de mecanismos activos y pasivos (Aguirre-Ghiso et al., "Metastasis Awakening: Targeting Dormant Cancer", Nat. Med. 19:276-277 (2013); Naumov et al., "Ineffectiveness of Doxorubicin Treatment on Solitary Dormant Mammary Carcinoma Cells or Late-Developing Metastases", Breast Cancer Res. Treat. 82(3):199-206 (2003); Oshimori et al., "TGF-Beta Promotes Heterogeneity and Drug Resistance in Squamous Cell Carcinoma", Cell 160:963-976 (2015); and Fluegen et al., "Phenotypic Heterogeneity of Disseminated Tumour Cells is Preset by Primary Tumour Hypoxic Microenvironments", Nat. Cell Biol. 19(2):120-132 (2017)). La erradicación de las CCD en la médula ósea, donde estas células también suelen estar inactivas (Bragado et al., "TGF-Beta2 Dictates Disseminate Tumor Cell Fate in Target Organs Through TGF-Beta-RIII and P38Alpha/Beta Signalling", Nat. Cell. Biol. 15:1351-1361 (2013); Chéry et al., "Characterization of Single Disseminated Prostate Cancer Cells Reveals Tumor Cell Heterogeneity and Identifies Dormancy Associated Pathways", Oncotarget 5(20):9939-51 (2014); Ghajar et al., "The Perivascular Niche Regulates Breast Tumour Dormancy", Nat. Cell Biol. 15:807-817 (2013); y Husemann et al., "Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer", Cancer Cell 13:58-68 (2008)), refuerza adicionalmente idea de la inhibición de PERK como una terapia contra CCD latentes (Aguirre-Ghiso et al., "Metastasis Awakening: Targeting Dormant Cancer", Nat. Med. 19:276-277 (2013)) que puede usarse en el entorno adyuvante para eliminar la enfermedad residual mínima latente (Aguirre-Ghiso et al., "Metastasis Awakening: Targeting Dormant Cancer", Nat. Med. 19:276-277 (2013)).

Los mecanismos exactos por los cuales la inhibición de la PERK cinasa bloquea el crecimiento tumoral no están claros. Es posible que la reducción de la adaptación al estrés impuesta por la proteotoxicidad (Singh et al., "HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive", Sci. Signal. 8:ra52 (2015)) sea un mecanismo. Los resultados descritos en el presente documento demuestran que LY4 reduce los niveles de fosfo-HER2 *in vivo* y que LY4 disminuye la abundancia del receptor activo en la membrana a través de una mayor endocitosis. No se observaron cambios en la degradación de la proteína HER2. En cuanto a cómo controla exactamente PERK la localización en la membrana o la endocitosis de HER2, es posible que la internalización del receptor permita una mejor o más rápida desfosforilación del receptor o disminuya las posibilidades de que el receptor se active, dando lugar a una disminución de la señalización descendente. Se ha demostrado que la endocitosis del receptor puede reducir la producción de señales de muchos receptores localizados en la membrana plasmática al reducir físicamente la concentración de los receptores de la superficie celular (Sorkin y Zastrow, "Endocytosis and Signaling: Redes moleculares entrelazadas", Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10:609-22 (2009)).

Los resultados del presente documento demuestran además que, en lesiones tempranas, LY4 indujo un fenotipo de diferenciación. Sin embargo, en tumores establecidos, LY4 empujó a los tumores hacia la estasia o la regresión como agente único. Este sostiene que, al principio, la desregulación de la señalización PERK en las lesiones tempranas HER2⁺ está más relacionada con la pérdida de programas de diferenciación, mediante mecanismos aún por determinar. Entonces, a medida que la biología del tumor cambia y se vuelve sumamente proliferativa, la dependencia de PERK sigue siendo alta en estos tumores HER2⁺. Esto puede estar relacionado con cómo cambian las funciones de HER2 durante la progresión; en los primeros estadios desregula principalmente un programa de morfogénesis que conduce a la resistencia y diseminación de anoikis, mientras que más tarde se dedica principalmente a programas proliferativos y de supervivencia.

Los resultados descritos en el presente documento también apuntan al valor de combinar terapias antiproliferativas estándar con LY4 que eliminarían las células inactivas restantes. Este enfoque se probó utilizando la combinación del inhibidor de CDK4/6 Abemaciclib seguido de LY4, lo que reveló un efecto antimetastásico mejorado. De forma alentadora, las dosis de LY4 utilizadas no afectaron significativamente a los niveles de glucosa, al recuento de células de la médula ósea o de sangre periférica, ni al comportamiento en cuanto a la bebida y alimentación de ratones sin tumores o con cáncer. Esto sostiene que las dosis utilizadas, al tiempo que bloquean gravemente el crecimiento tumoral y la metástasis mediante la erradicación de CCD latentes, no afectaron a la función normal de los órganos del hospedador. Dado que también se ha observado que las CCD latentes/RPD^{alta} regulan negativamente la expresión superficial de MHC-I (Pommier et al., "Unresolved Endoplasmic Reticulum Stress Engenders Immune-Resistant, Latent Pancreatic Cancer Metastases", Science 360(6394):eaao4908 (2018)), LY4 también puede ayudar a que la respuesta inmunitaria adaptativa se dirija a las CCD y quizás también a los tumores establecidos. El trabajo actual aborda esa posibilidad. Los resultados descritos en el presente documento abren la puerta al uso de terapias de supervivencia contra CCD latentes como una nueva forma de dirigirse a la enfermedad metastásica. Esto permitiría abordar toda la heterogeneidad fenotípica de la enfermedad diseminada, que puede incluir CCD proliferativas, de ciclo lento y latentes. (Aguirre-Ghiso et al., "Metastasis Awakening: Targeting Dormant Cancer", Nat. Med. 19:276-277 (2013)).

Ejemplo 8 - Combinación del inhibidor de CDK4/6, Abemaciclib, y del inhibidor de PERK, LY4, en una línea celular de melanoma

Dado que se ha demostrado que los inhibidores de CDK4/6 inducen la detención del ciclo celular y que LY4 induce la muerte celular en CTD latentes con detención del ciclo celular (FIG. 12A), a continuación se investigó si la combinación de un inhibidor de CDK4/6 y LY4 reduciría la viabilidad celular en una línea celular *in vitro*. Se ha demostrado que el

inhibidor de CDK 4/6, Abemaciclib, inhibe el crecimiento de células de melanoma WM35 en cultivos celulares *in vitro* tanto en 2D como en 3D. El tratamiento *in vitro* de corta duración (48 horas) con LY4 2 μ M después de 1 semana de pretratamiento con Abemaciclib 50 nM (2D) disminuye la viabilidad de las células de melanoma WM35 con mutación de Braf, en comparación con el tratamiento de células con LY4 2 μ M en solitario (FIG. 12B). En los cultivos 3D *in vitro*, la adición de LY4 2 μ M después de un pretratamiento con Abemaciclib de 1 semana tuvo un efecto aditivo en la disminución de la viabilidad celular (FIG. 12C). Los resultados demostrados en la FIG. 12C sugieren que el pretratamiento con Abemaciclib puede inducir una detención del crecimiento y cierta muerte celular en cultivos celulares 3D. La adición de LY4 parece potenciar ese efecto sobre la muerte celular. Esto concuerda con la idea de que las células detenidas por Abemaciclib pueden regular positivamente una respuesta al estrés del RE como se muestra por la regulación positiva de GADD34 (FIG. 12G) y después volverse sensibles a LY4.

En las células de melanoma, surge un fenotipo resistente a Abemaciclib después de 4 a 5 semanas de tratamiento continuo. El tratamiento conjunto de células con LY4 y Abemaciclib disminuye el número de células viables resistentes a Abemaciclib en cultivos celulares 2D, pero no muestra una mejora como se esperaba al realizar estos experimentos en cultivos 2D. Sin embargo, en las células resistentes a Abemaciclib, LY4 tiene un efecto aditivo en la disminución de la viabilidad en cultivos celulares 3D después del tratamiento persistente con Abemaciclib (FIG. 12D-12E). Estos datos sostienen que las células resistentes al inhibidor de CDK4/6 del melanoma siguen dependiendo de la respuesta al estrés del RE mediada por PERK para sobrevivir. En los cultivos 3D *in vitro*, la adición de LY4 después de 5 semanas de pretratamiento con Abemaciclib, tuvo un efecto aditivo en la disminución de la viabilidad celular (FIG. 12F), medida por la apoptosis de las células que absorben DAPI. Aunque las células resistentes crecen tan bien como las células de control en cultivos 2D, el pretratamiento con Abemaciclib parece inducir la muerte celular en cultivo 3D (FIG. 12F).

Ejemplo 9 - BMP7-F9 induce y mantiene la latencia de las CTD (HNSCC)

BMP7-F9 reduce la proporción de actividad ERK/p38 e induce varios ARNm en la firma distintiva de latencia (FIG. 13A-13C). La figura 13A muestra que el tratamiento con BMP7-F9 a 2 ng/ml, 5 ng/ml y 10 ng/ml (segunda, tercera y cuarta barras grises, respectivamente; el control es la primera barra negra) reduce la proporción de actividad ERK/p38 sobre el control, determinada mediante transferencia Western en células HEP3 HNSCC. El efecto sobre la proporción de actividad ERK/p38 se observa después de 2-6 y 24 horas (del segundo al cuarto grupo de columnas). En los 30 primeros minutos, la actividad de ERK es estimulada por BMP7 (primera columna). La figura 13B muestra que el tratamiento con BMP7-F9 induce los ARNm de DEC2, p53 y p27 (BMP7-F9 10 ng/ml, 24 horas), que codifican genes con firma distintiva de latencia. La figura 13C muestra que el tratamiento con BMP7-F9 de las mismas células induce la acumulación nuclear de NR2F1, un fuerte factor de transcripción inductor de latencia, determinada mediante inmunofluorescencia (10 ng/ml, 24 horas). Diferencias en la FIG. 13A y FIG. 13B, el valor de $p < 0,05$ se calculó mediante la prueba de la t de Student.

BMP7-F9 induce *in vitro* e *in vivo* la detención del crecimiento de las células T-HEP3 (FIG. 14A-14E). La figura 14A muestra que el tratamiento con BMP7-F9 de células T-HEP3 inhibe su proliferación *in vitro* durante 48 horas, determinada mediante ensayo con cell titer blue (UFR, unidades de fluorescencia relativa). La figura 14B es una ilustración esquemática del procedimiento experimental *in vivo* utilizado en las figuras 14C-14D. Las células T-HEP3 se trataron previamente durante 24 horas con BMP7-F9 *in vitro* y después se inocularon en membranas corioalantoideas (CAM) de embriones de pollo (FIG. 14C), donde se trataron diariamente *in vivo* con vehículo o BMP7-F9 (50 ng/ml) antes de extirpar los tumores y cuantificar el número de células/tumor HEP3 HNSCC (FIG. 14D) y los niveles de P-H3 (FIG. 14E).

Siguiendo el protocolo de la figura 15A, durante 3 y 6 semanas, se trataron ratones NSG. En esos puntos temporales, se puntuó el porcentaje de recidiva local y la incidencia de CTD. A continuación se muestran los resultados tabulados correspondientes a la FIG. 15B, que muestran que la BMP7 limita la incidencia de recidivas locales (Tabla 9) y la incidencia de CTD en pulmones (Tabla 10) después de cirugía del tumor (Tabla 11).

Tabla 9. Efecto de BMP7-F9 en el entorno adyuvante sobre las recidivas locales en los bordes de la cirugía

Tratamiento (solo tratamiento adyuvante)		n	+recidiva local	Incidencia de recidiva local (%)
3 semanas	control	11	4	36,4
	BMP7	11	1	9,1
6 semanas	control	8	2	25,0
	BMP7	7	0	0,0

Tabla 10. Efecto de BMP7-F9 sobre la incidencia de CCD en los pulmones

Tratamiento (solo tratamiento adyuvante)		n	+CCD en los pulmones	Incidencia de CCD (%)
3 semanas	control	11	9	81,8
	BMP7	10	5	50,0
6 semanas	control	8	6	75,0
	BMP7	7	3	42,9

Tabla 11. Mediana del número de células tumorales GFP⁺/Vimentina⁺/Pulmón en los mismos experimentos representados en las figuras 15A-15B y en las Tablas 9 y 10

Tratamiento (solo tratamiento adyuvante)		n	Mediana del número de células tumorales GFP ⁺ /Vimentina ⁺ /pulmón	intervalo	valor de p
3 semanas	control	11	2,2E+04	0-1,14E+06	0,2294
	BMP7	10	0,62E+04	0-333333	
6 semanas	control	8	25,2E+04	0-1,05E+06	0,2859
	BMP7	7	0	0-6,8E+06	

5 Tumores HEp3-GFP HNSCC crecieron hasta que midieron aproximadamente 300 mm³ y después se trataron en el entorno neoadyuvante con 50 µg/kg de BMP7-F9 hasta que los tumores midieron aproximadamente 600 mm³. A continuación, los tumores se extirparon con cirugía. 1-2 días después de la cirugía, el tratamiento adyuvante con BMP7-F9 se continuó durante otras 4 semanas. Después, se sacrificó a los animales y con un microscopio de fluorescencia se puntuó la carga de CCD en los pulmones. Se observó que BMP7 limita el desarrollo de recidivas locales y distantes después de la cirugía del tumor. Siguiendo el protocolo de la figura 15A, durante 4 semanas, se trataron ratones NSG. En esos puntos temporales, se puntuó el porcentaje de recidiva local y la incidencia de las CCD. El número de células GFP positivas en pulmones disociados se puntuó después del tratamiento. Esta es una medida de la carga de CCD en los pulmones, que disminuye significativamente con el tratamiento de BMP7-F9. Cada apreciar que la mediana de la carga de CCD desciende un log y que la BMP-7 cura aparentemente de CCD a 3 de 7 animales.

A continuación se muestra el efecto de BMP7-F9 en el entorno adyuvante + neoadyuvante sobre las recidivas locales en los bodes de la cirugía (Tabla 12) y la incidencia de CCD en los pulmones (Tabla 13). Los resultados se tabulan a partir de los resultados de la FIG. 15C, donde los ratones se tratados como en la FIG. 15A, excepto que el tratamiento adyuvante fue durante 4 semanas. El número de células GFP positivas en pulmones disociados se puntuó después del tratamiento. Los resultados demuestran que BMP7 limita la incidencia de recidivas locales (Tabla 12) y la incidencia de CCD en los pulmones (Tabla 13) posterior a la cirugía del tumor con un tratamiento neoadyuvante y adyuvante. La Tabla 14 muestra una medida de la carga de CCD en los pulmones, que disminuye significativamente con el tratamiento con BMP7-F9. Cada apreciar que la mediana de la carga de CCD desciende un log y que la BMP-7 cura aparentemente de CCD a 3 de 7 animales.

Tabla 12. Efecto de BMP7-F9 en el entorno neoadyuvante + adyuvante sobre las recidivas locales en los bordes de la cirugía

Tratamiento (tratamiento neoadyuvante y adyuvante)		n	+recidiva local	%
4 semanas	control	8	5	62,5
	BMP7	7	3	42,9

Tabla 13. Incidencia de CCD en los pulmones

Tratamiento (tratamiento neoadyuvante y adyuvante)		n	+CCD en los pulmones	%
4 semanas	control	8	8	100
	BMP7	7	4	57,1

Tabla 14. Mediana del número de células tumorales GFP⁺/Vimentina⁺/pulmón de ratones, registradas en las Tablas 12 y 13.

Tratamiento (tratamiento neoadyuvante y adyuvante)		n	Mediana del número de células tumorales GFP ⁺ /Vimentina ⁺ /pulmón	intervalo	valor de <i>p</i>
4 semanas	control	8	5,4E+04	0,02-3,2E+05	0,046
	BMP7	7	0,02E+04	0-2,4E+04	

- 5 Aunque en el presente documento se han representado y descrito detalladamente realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la materia que se pueden realizar diversas modificaciones, adiciones, sustituciones y similares.

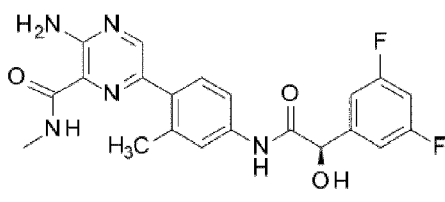
REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK) para su uso en un método de tratamiento de cáncer residual mínimo en un sujeto, comprendiendo dicho método:

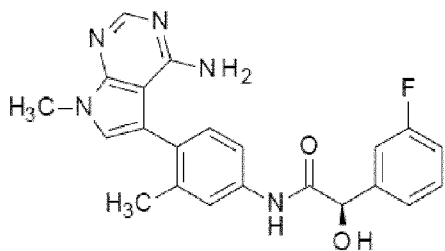
poner en contacto células cancerosas diseminadas (CCD) de un sujeto con el inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK), en donde dicha puesta en contacto erradica las CCD en el sujeto para tratar un cáncer residual mínimo en el sujeto;

en donde dicho inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK), se selecciona de

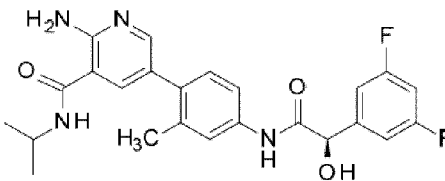
3-amino-6-[4-[[[(2R)-2-(3,5-difluorofenil)-2-hidroxi-acetil]amino]-2-metil-fenil]-N-metil-pirazin-2-carboxamida (LY2), que tiene una estructura química



(2R)-N-[4-(4-amino-7-metil-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il)-3-metilfenil]-2-(3-fluorofenil)-2-hidroxi- acetamida (LY3), que tiene una estructura química



y
2-amino-5-[4-[[[(2R)-2-(3,5-difluorofenil)-2-hidroxi-acetil]amino]-2-metil-fenil]-N-isopropil-piridin-3-carboxamida (LY4), que tiene una estructura química



2. El inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK), para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

(a) al sujeto se le ha diagnosticado cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, linfoma de células del manto, leucemia, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, melanoma, cánceres de piel, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma, neuroblastoma o cáncer colorrectal; opcionalmente

en donde el cáncer es cáncer de mama seleccionado de cáncer de mama invasivo, carcinoma ductal *in situ* (CDIS), carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS) y cáncer de mama inflamatorio; opcionalmente

en donde el cáncer de mama es un cáncer de mama HER2⁺; o

(b) al sujeto se le ha diagnosticado tener células tumorales diseminadas y/o un cáncer no metastásico.

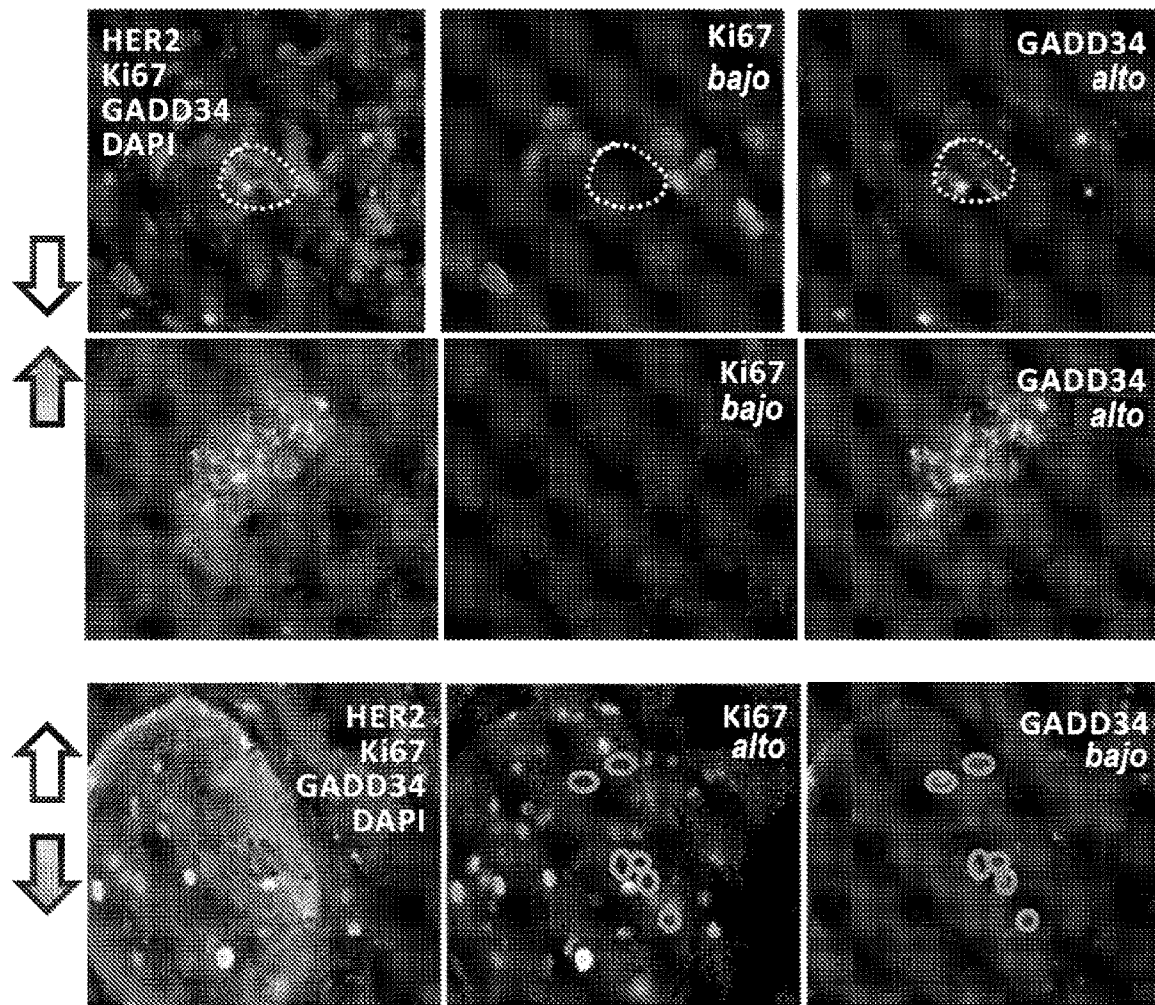
3. El inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK), para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además administrar al sujeto un agente quimioterápico, un agente inmunoterápico, un agente epigenético o radiación ionizante; opcionalmente

en donde al sujeto se le administra un agente quimioterápico, un agente inmunoterápico o un agente epigenético, y en donde:

(a) el agente quimioterápico es un agente quimioterápico anti-HER2 seleccionado de trastuzumab (Herceptin®) y

- lapatinib (Tykerb®);
 (b) el agente quimioterápico se selecciona de una antraciclina, un taxano, un inhibidor de cinasa, un anticuerpo, una fluoropirimidina y un fármaco de platino;
 (c) el agente inmunoterápico se selecciona de un inhibidor del punto de control inmunitario, un interferón o una vacuna tumoral; o
 (d) el agente epigenético se selecciona de un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC), 5-azacitidina, ácido retinoico, trióxido de arsénico, un inhibidor de la subunidad 2 del complejo represivo potenciador de Zeste 2 Polcomb (EZH2), inhibidor de bromodominio ("BRD") y derivados de los mismos.
- 5
- 10 4. El inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK), para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además:
 detectar la presencia de CCD en el sujeto antes de dicha puesta en contacto; opcionalmente en donde las CCD son:
- 15 (a) NR2F1⁺; y/o
 (b) fosfo-PERK activo.
5. El inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK), para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde las CCD son positivas para el receptor de la proteína morfogénica ósea ("BMPR⁺").
- 20 6. El inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK), para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el método comprende además poner en contacto las CCD del sujeto con una proteína derivada de la proteína morfogenética ósea 7 (BMP7) administrando al sujeto la proteína derivada de BMP7, en donde la proteína derivada de BMP7 es BMP7-F9 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
- 25 7. El inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK), para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el inhibidor de PERK no inhibe EIF2AK1, EIF2AK2 o EIF2AK4.
8. El inhibidor de cinasa del retículo endoplásmico de tipo proteína ARN cinasa (PERK), para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el sujeto es:
- 30 (a) un ser humano; y/o
 (b) antes de dicha puesta en contacto, su cáncer está en remisión.

Metástasis de cáncer de mama de ratón MMTV-neu



100 % exclusión: GADD34 + /Ki67-

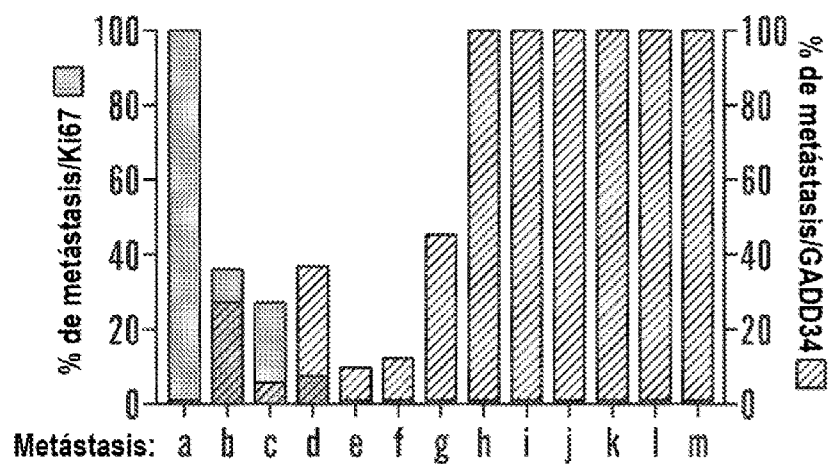


FIG. 1A

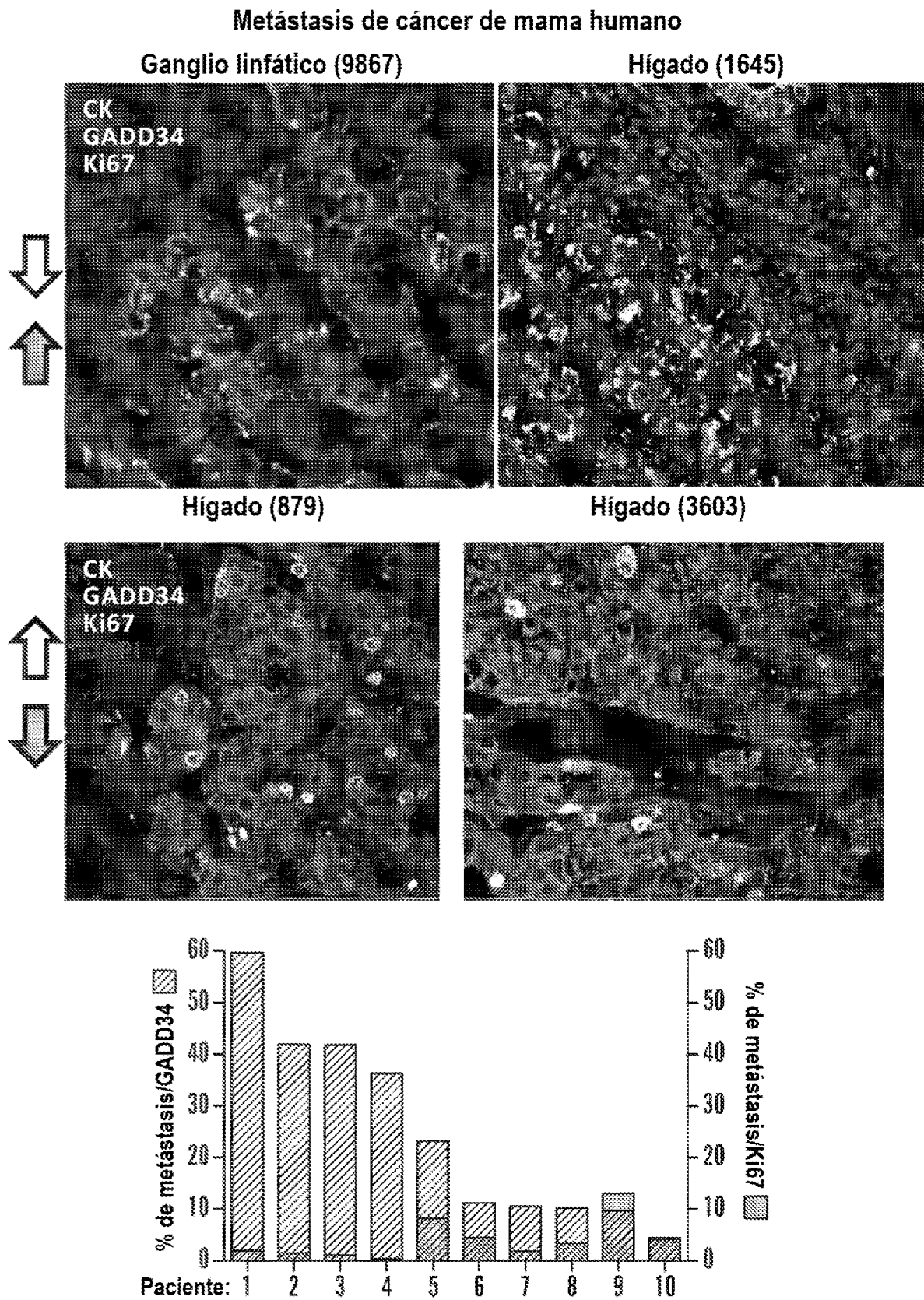
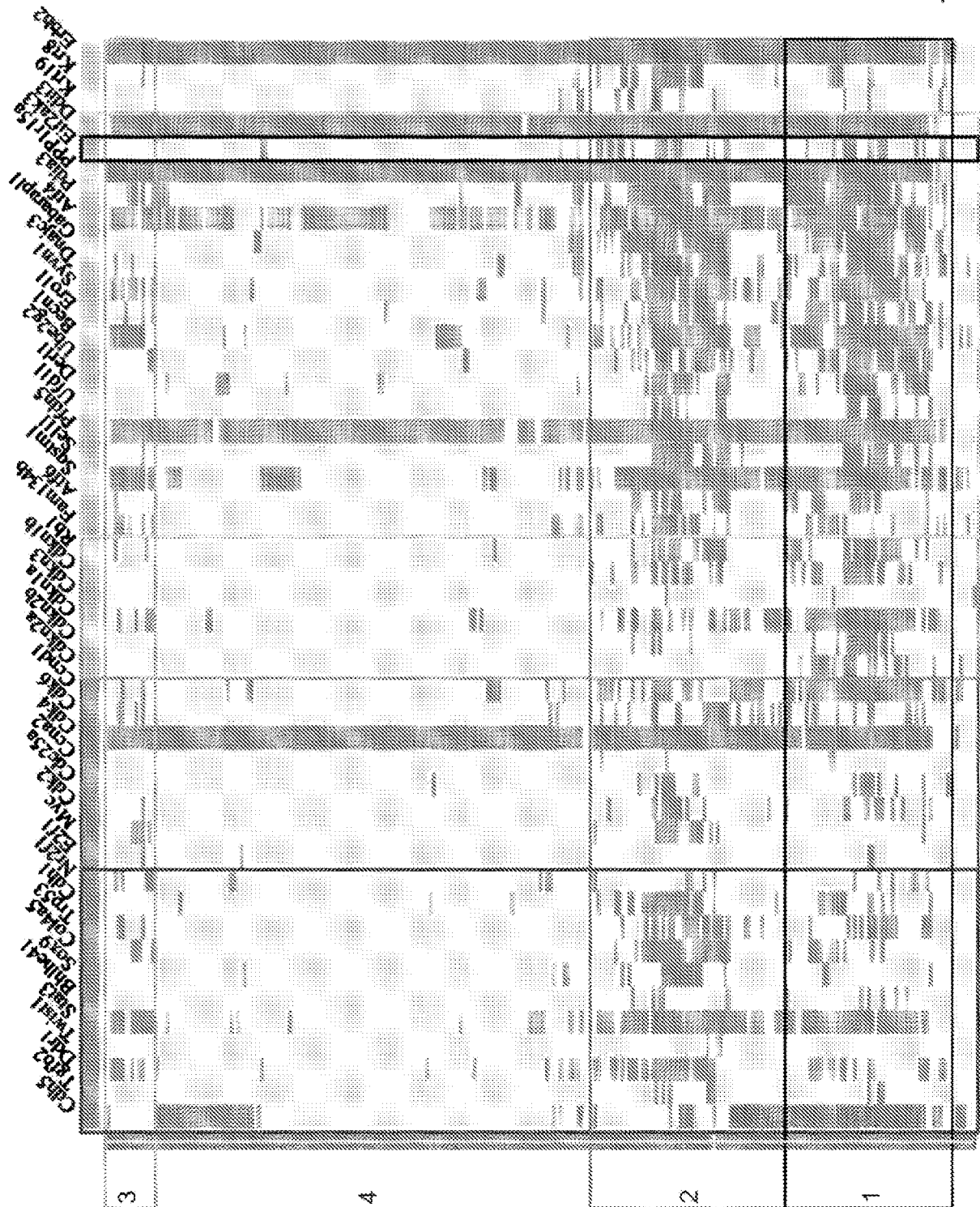


FIG. 1B



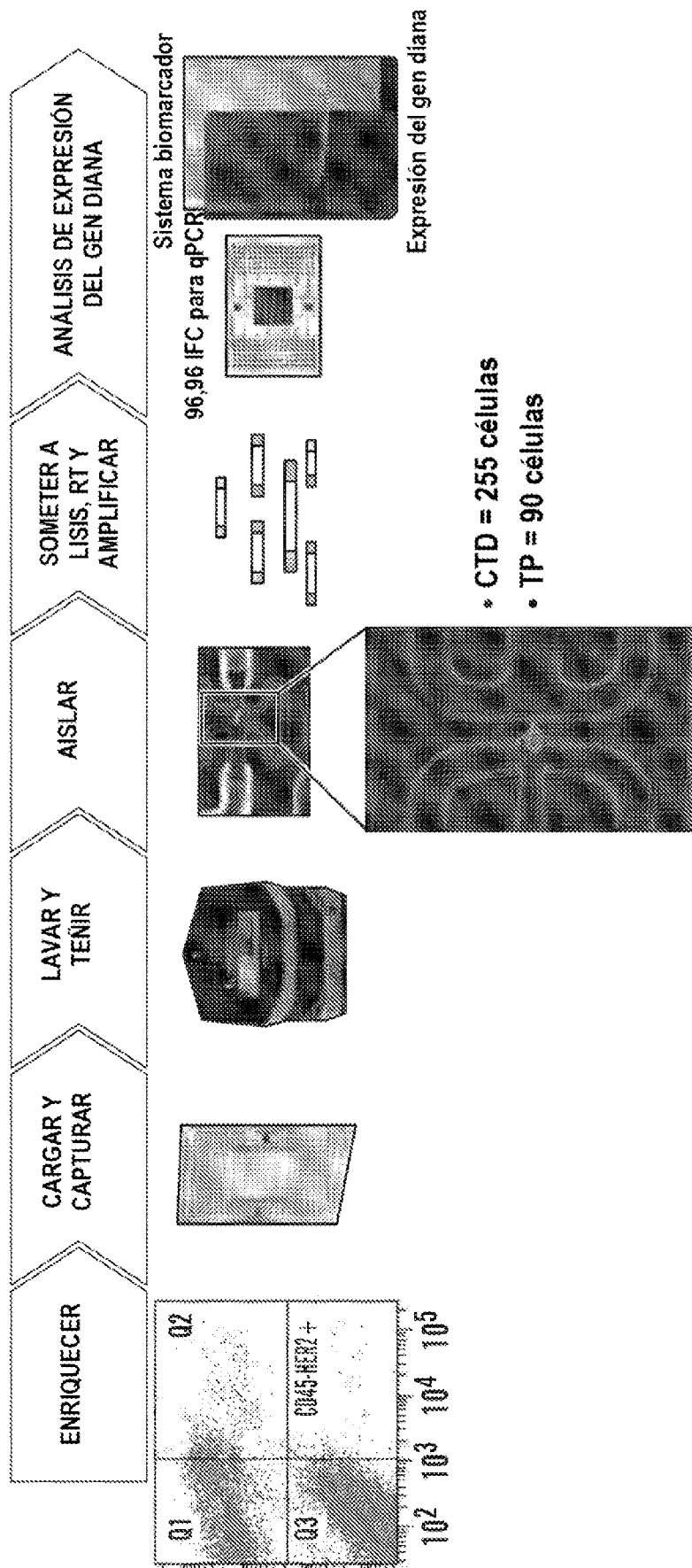


FIG. 2A

Ciclo celular AL ALZA	Estrés del RE	Latencia
Cdk4	Eif2ak3	Trp53
Cdc25a	Atf4	Bhlhe41
Cdk2	Ero1l	Cdh1
Ccne1	Pfdn5	Sox9
Myc	Fam134b	Stat3
E2f1	Ddit3	Twist1
Cdk6	PPP1r15a	Tgfb2
Ccnd1	Gabarapl1	Ddr1
Ccna2	Derl1	Col4a5
Ciclo celular A LA BAJA	Pdia3	Nr2f1
	Dnajc3	Cdh5
Cdkn1a	Becn1	ID de célula
Cdkn2b	Syvn1	
Cdkn2a	Ube2g2	ErbB2
Cdkn1b	Ufd1l	
Rb1	Sel1l	
Cdkn3	Atf6	
Trp53	Sqstm1	

FIG. 2B

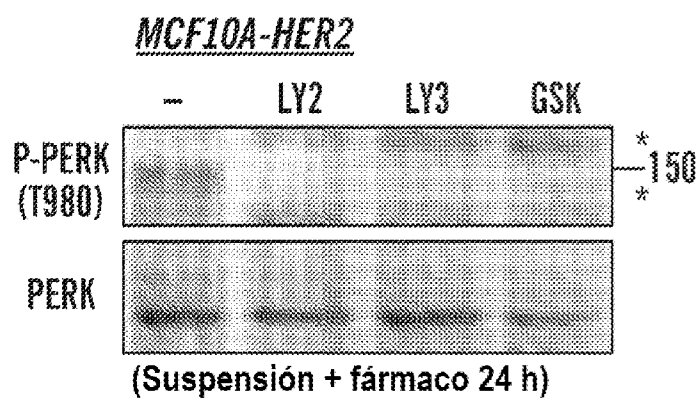


FIG. 2C

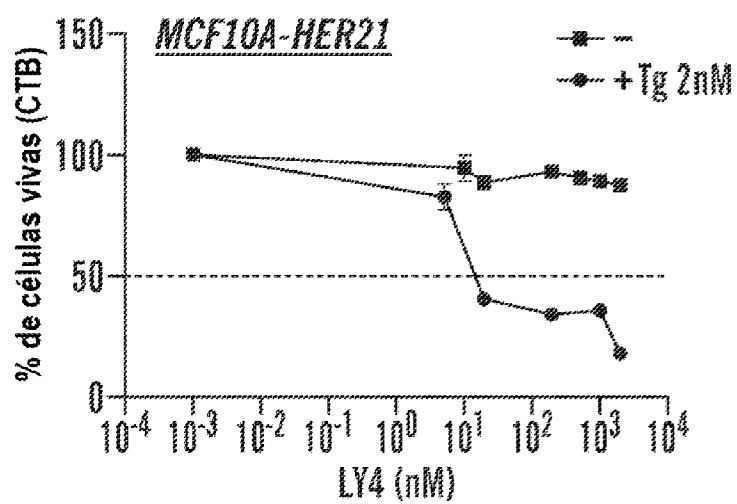
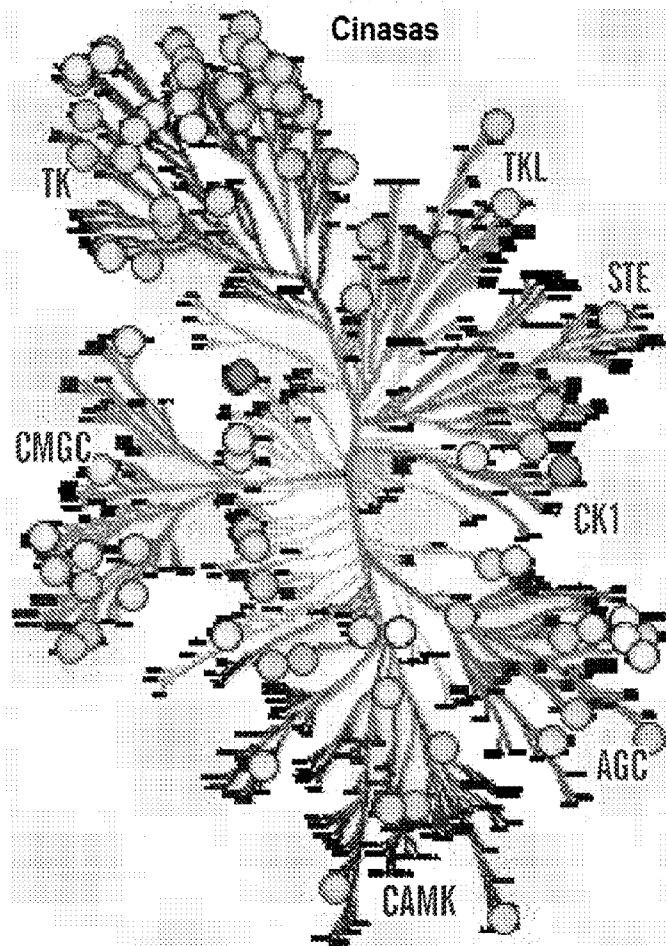


FIG. 2D

LY4

Ensayo basado en células PERK

$CI_{50} = 0,054 \mu M$



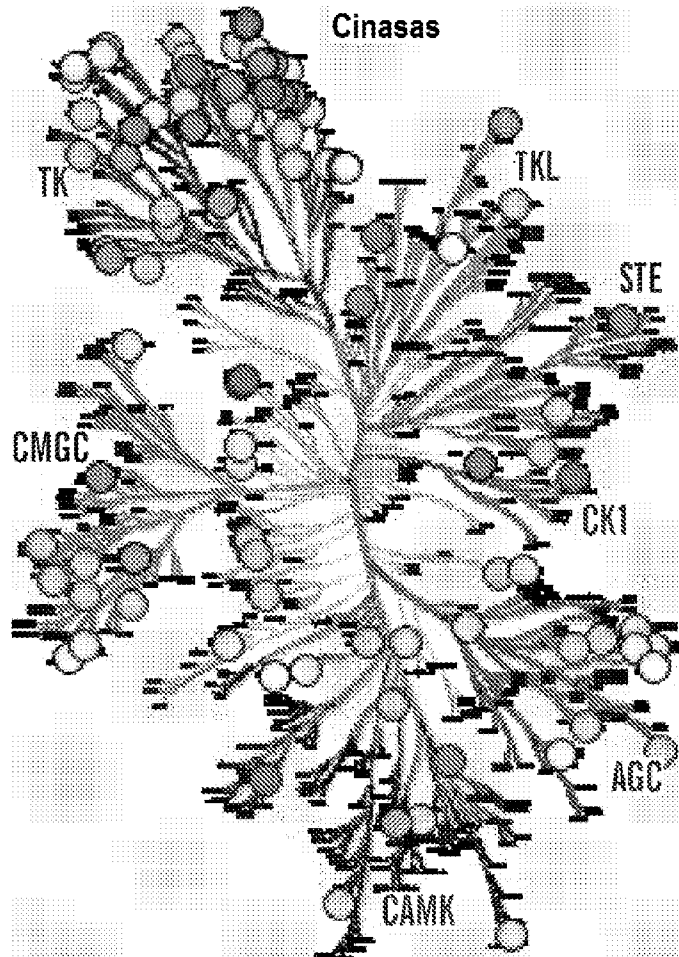
Ninguna otra actividad por debajo de $15 \mu M$

FIG. 2E

LY2

Ensayo basado en células PERK

$CI_{50} = 0,117 \mu M$



Otras actividades

FGFR3 CI_{50} 0,088 μM

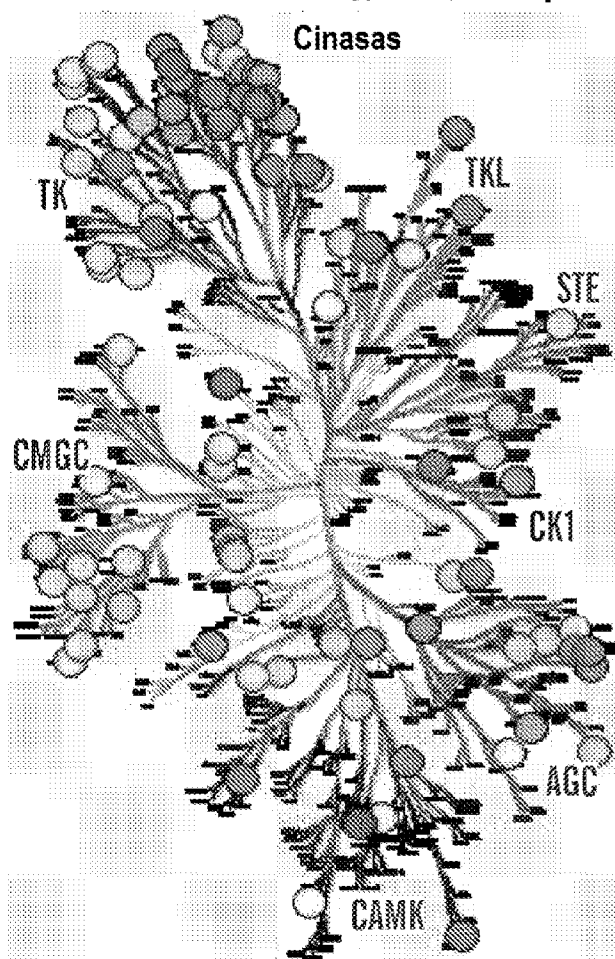
CI_{50} 1-5 μM (ALK, AXL, CDK7,
CSNK1E, EPHA7, FLT1,3,4,
GSK3 β , HIPK2
KDR, STK17A, WEE1)

FIG. 2E (cont.)

LY3

Ensayo basado en células PERK

$CI_{50} = 0,026 \mu M$



Otras actividades

Flt3 CI_{50} 0,100 μM

MNK2 CI_{50} 0,230 μM

NTRK CI_{50} 0,63 μM

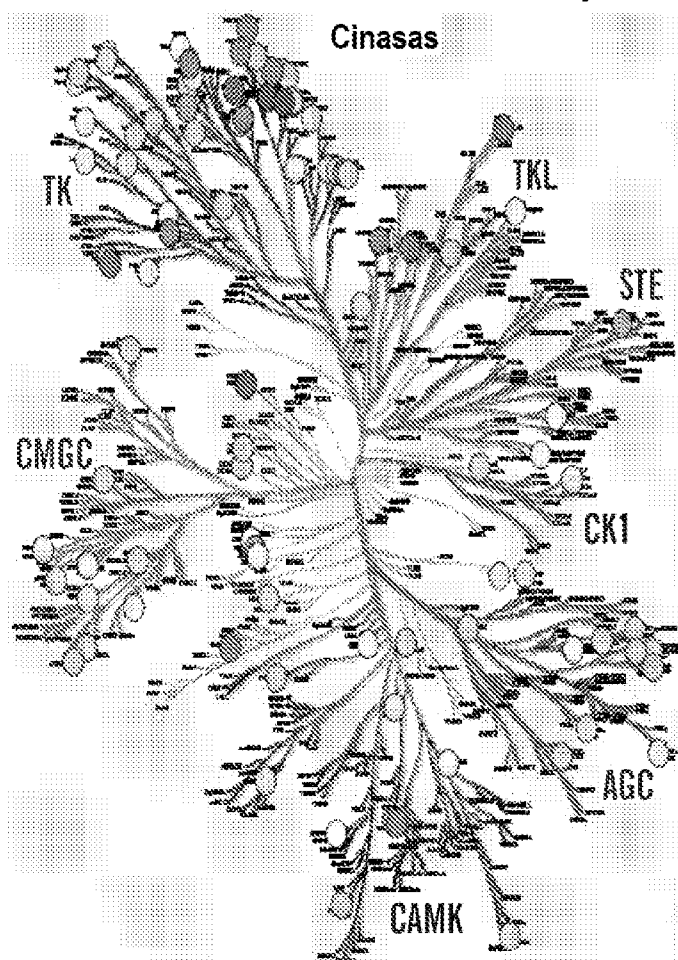
CI_{50} 1-5 μM (AKT1, AXL, FLT4, CHEK2, IKBKE, JAK1, LIMK1, MET, MST1R, MUSK, NTRK2, PDGFR α , PDPK1, PTK6, STK17A, WEE1)

FIG. 2E (cont.)

GSK2656157

Ensayo basado en células PERK

$CI_{50} = 0,036 \mu M$



Otras actividades

AXL CI_{50} 0,480 μM

CI_{50} 1-5 μM (ABL; BRK,
FLT3, FLT4, IRAK1, TRK-A)

FIG. 2E (cont.)

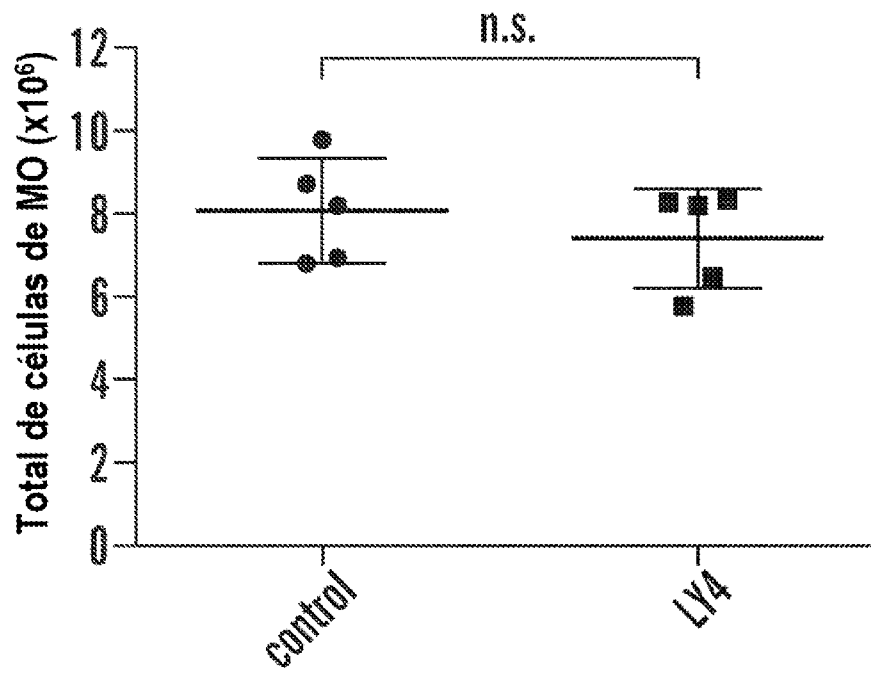


FIG. 2F

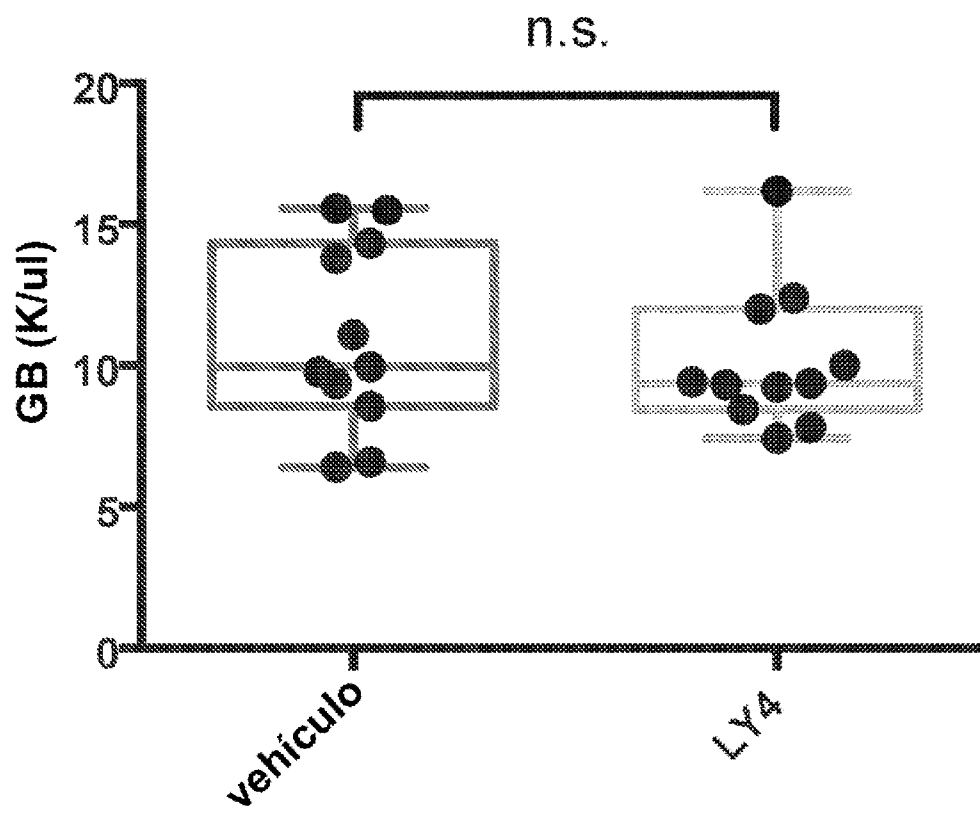


FIG. 2G

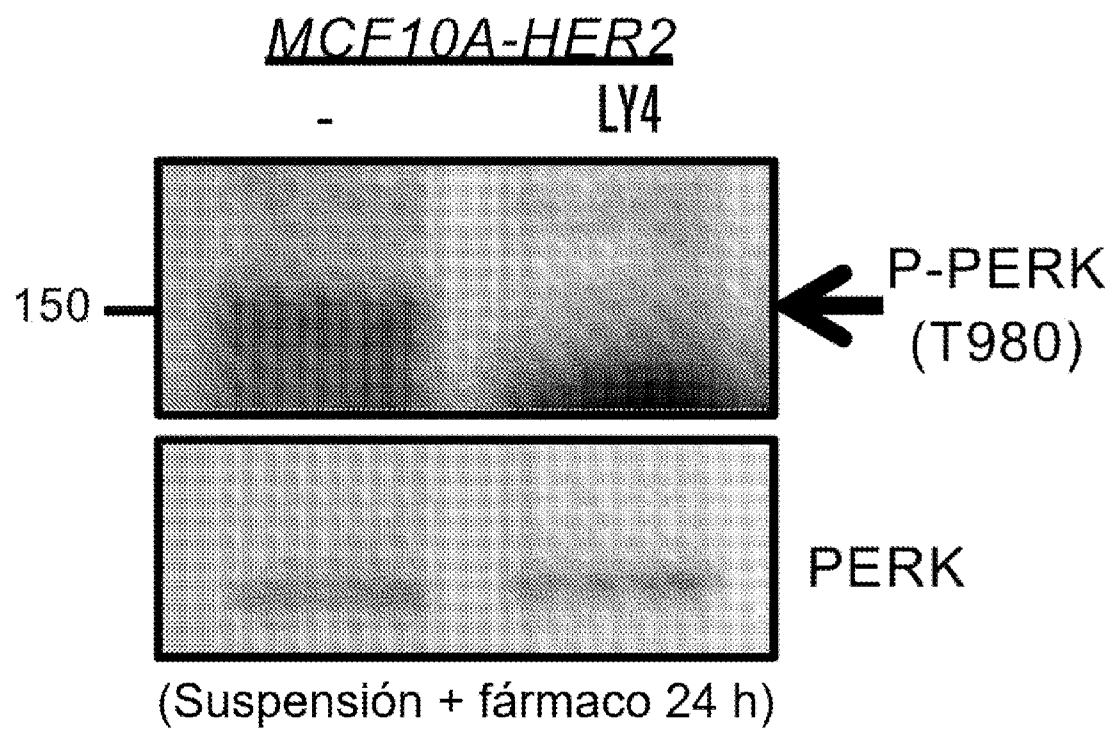
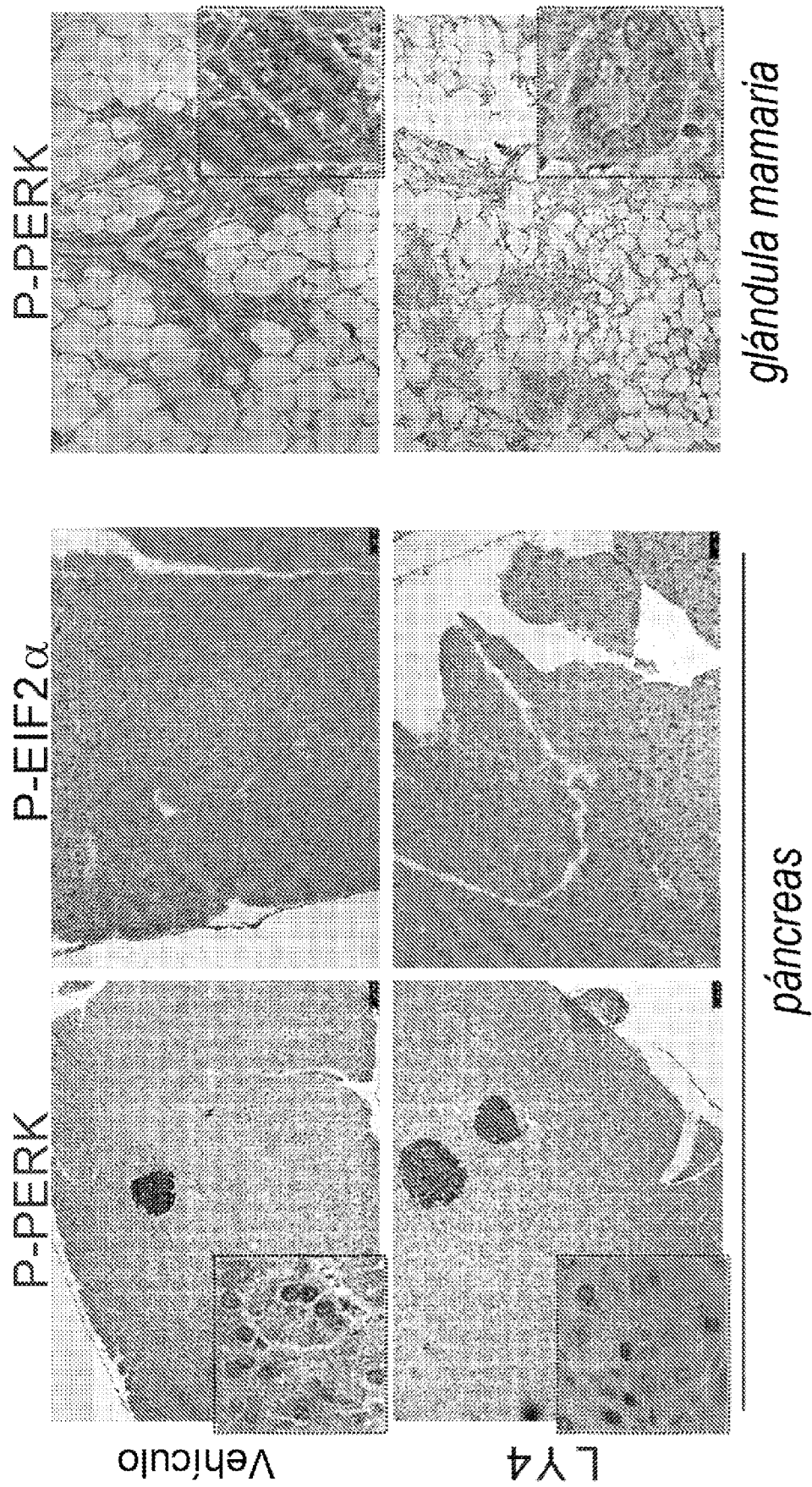


FIG. 3A

Modelo de câncer de mama MMTV-neu/HER2+



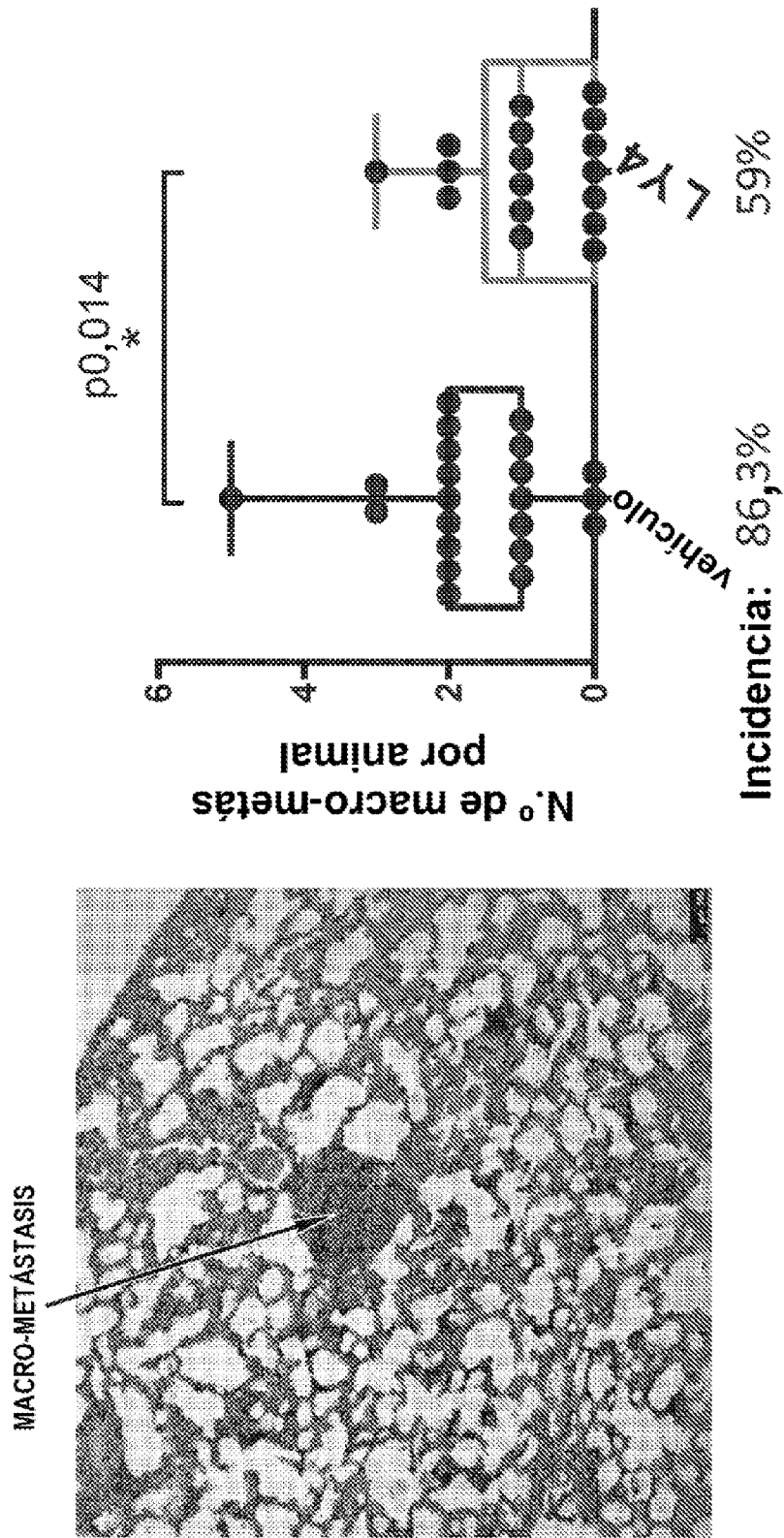


FIG. 3C

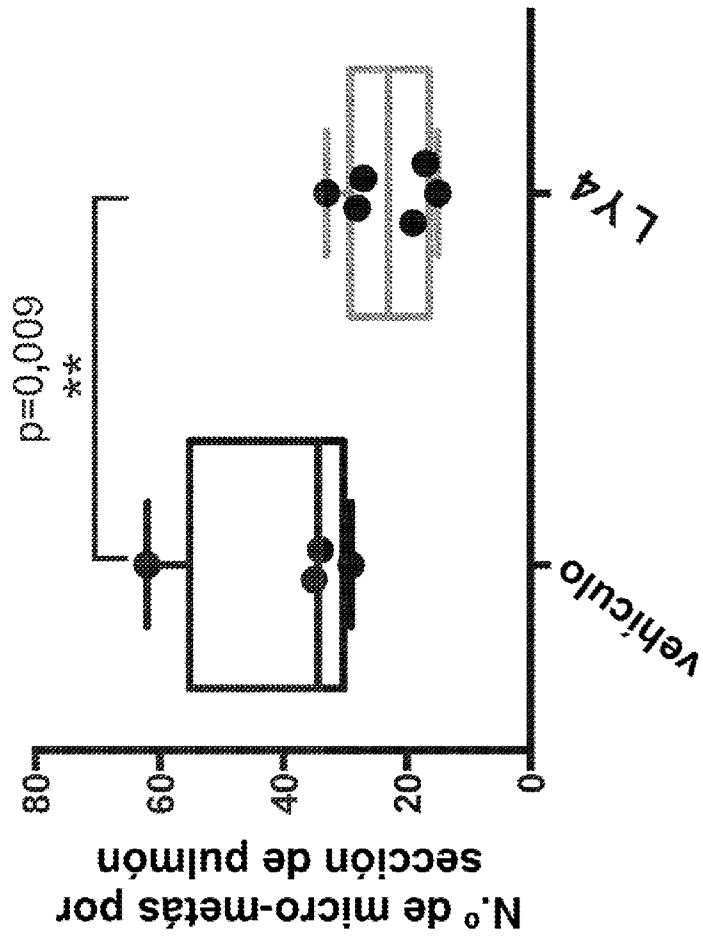
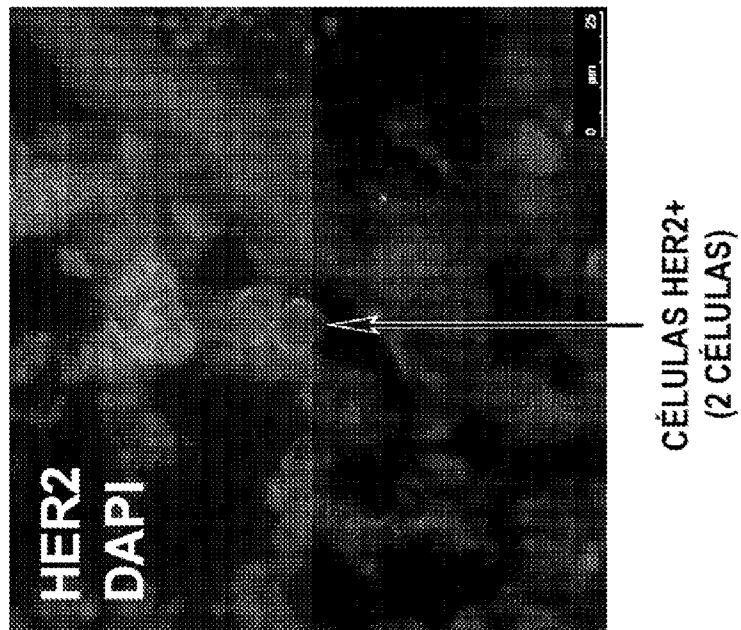


FIG. 3D



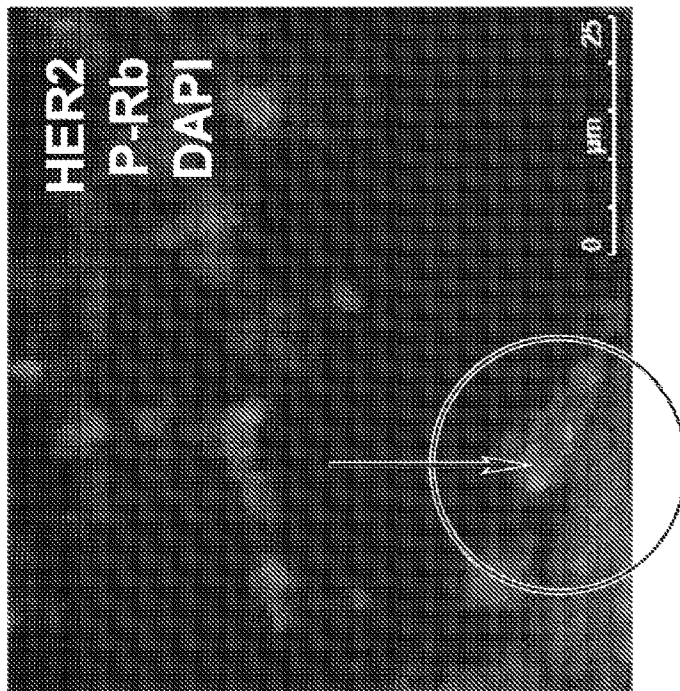
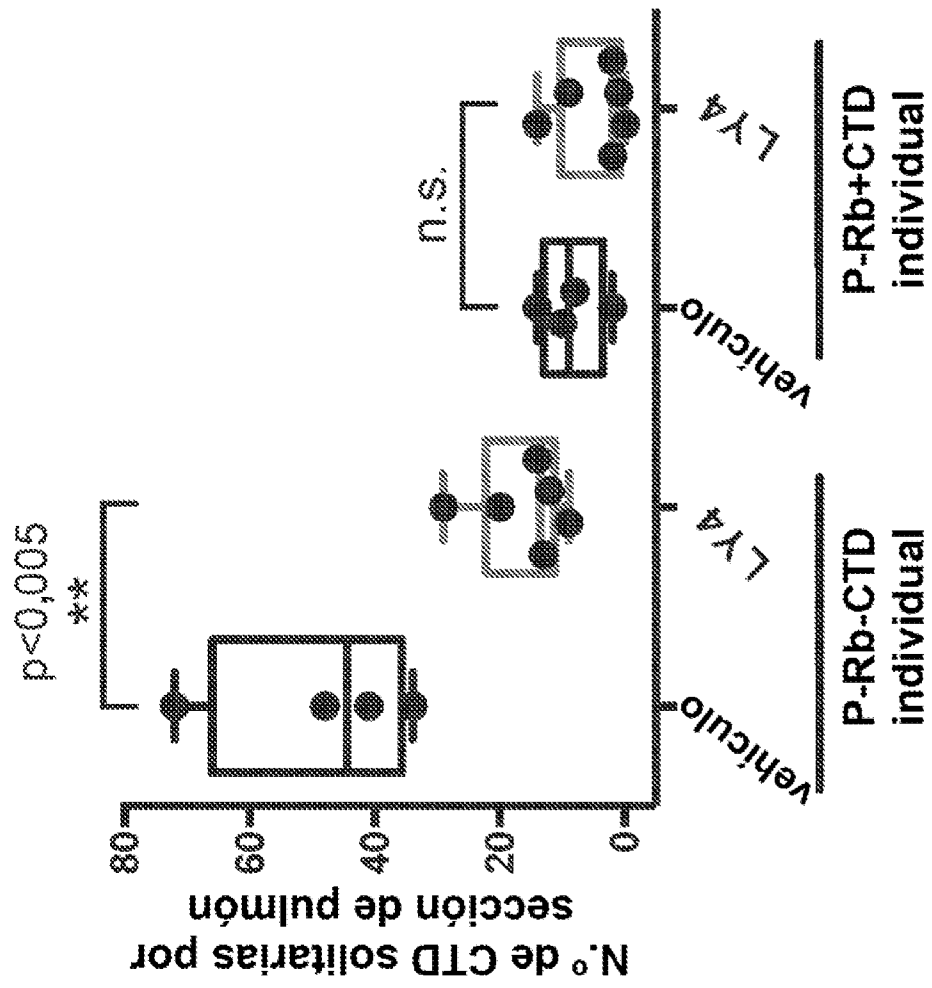


FIG. 3E

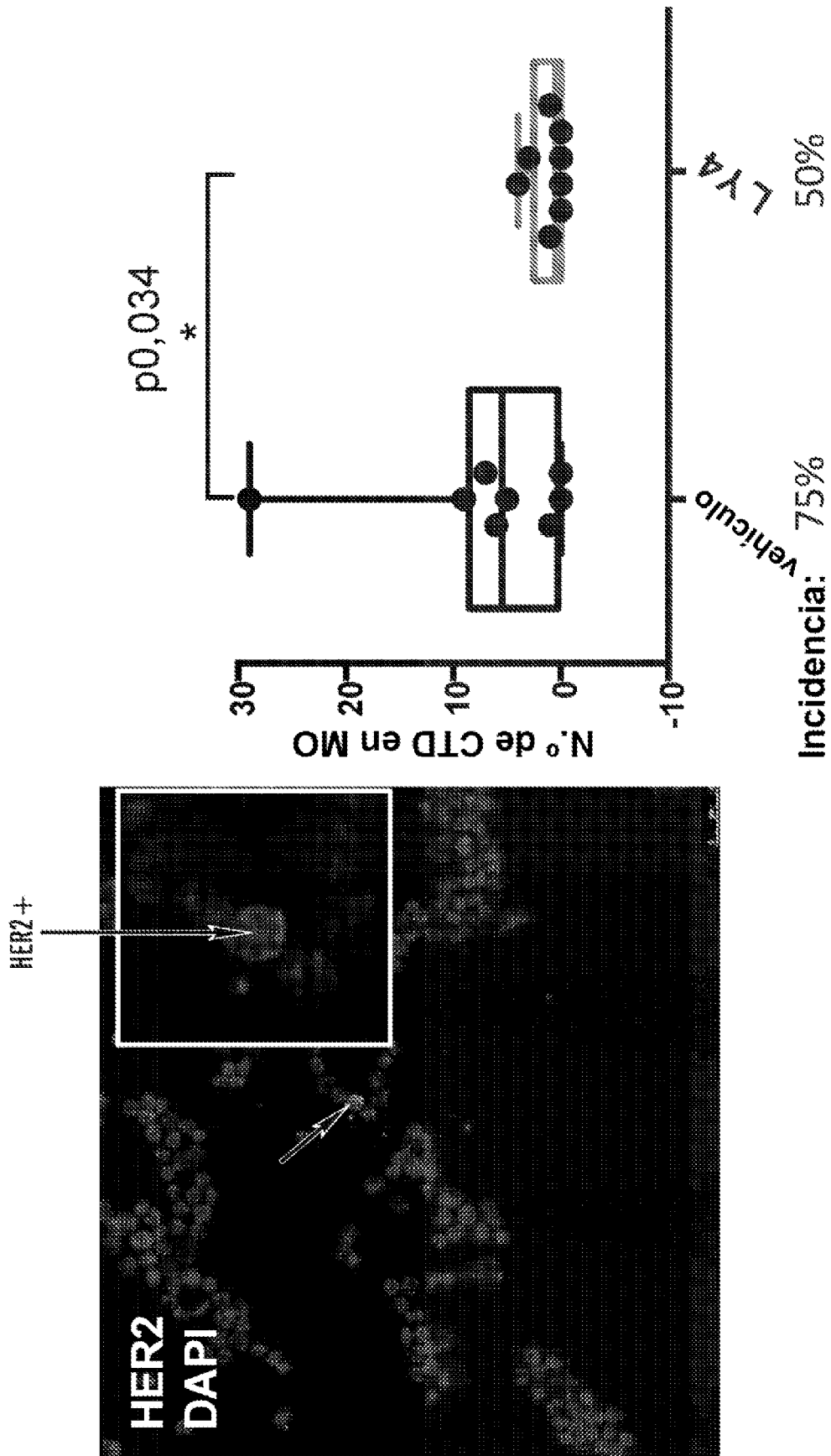
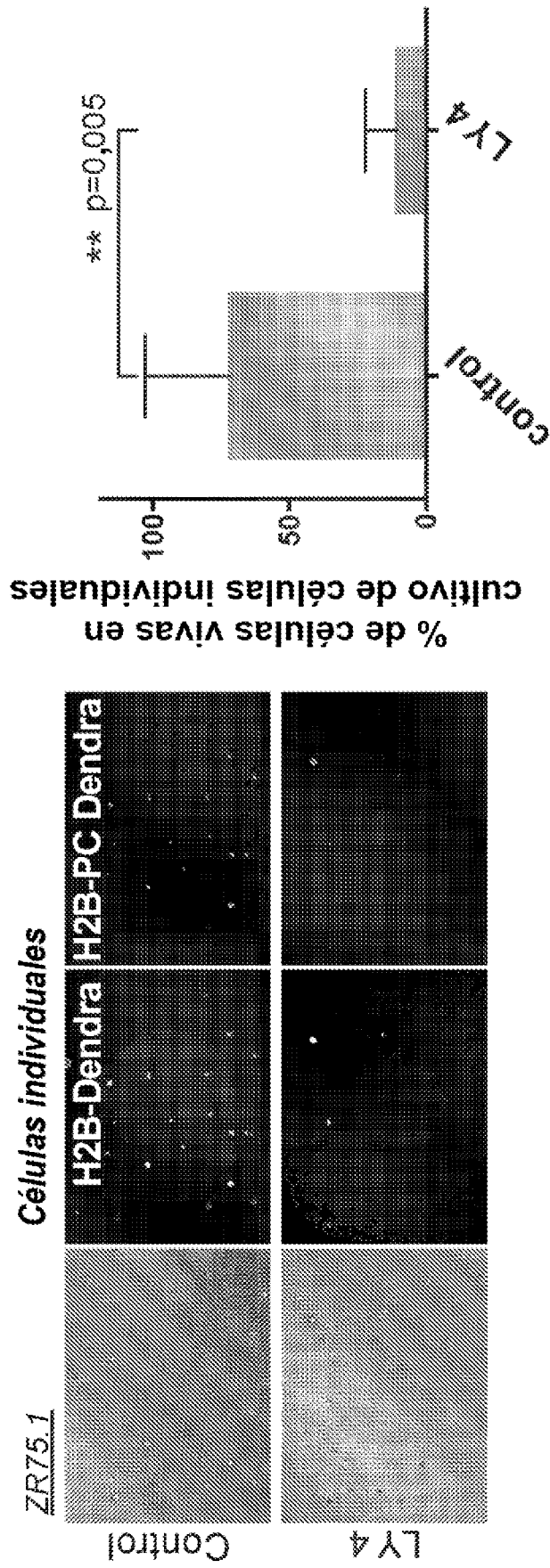


FIG. 3F



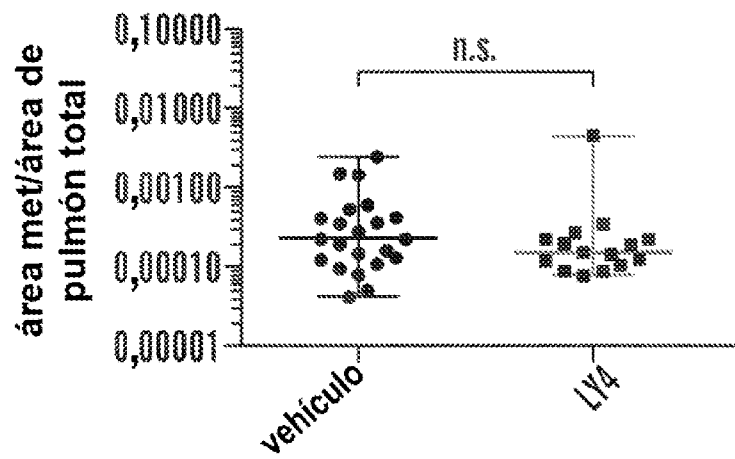


FIG. 4A

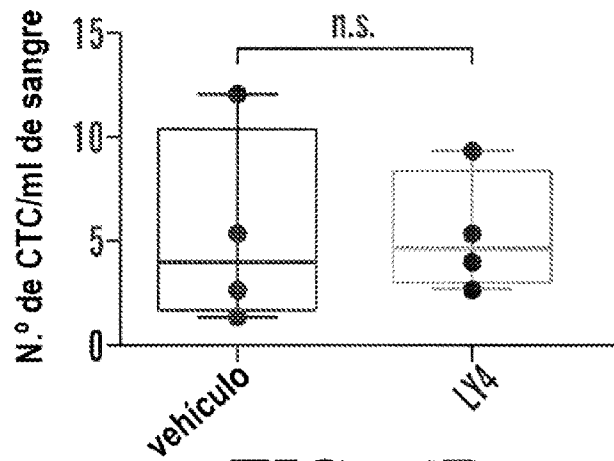


FIG. 4B

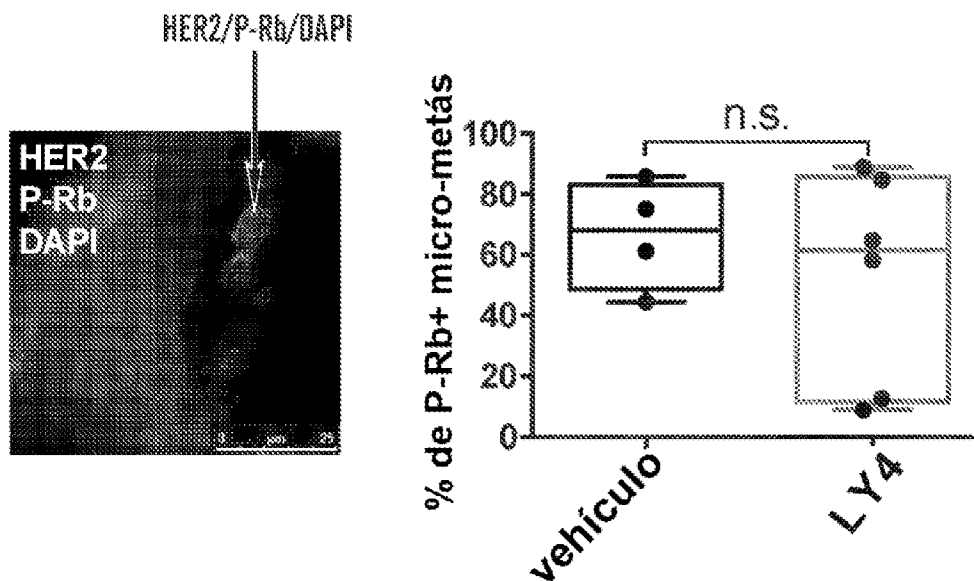


FIG. 4C

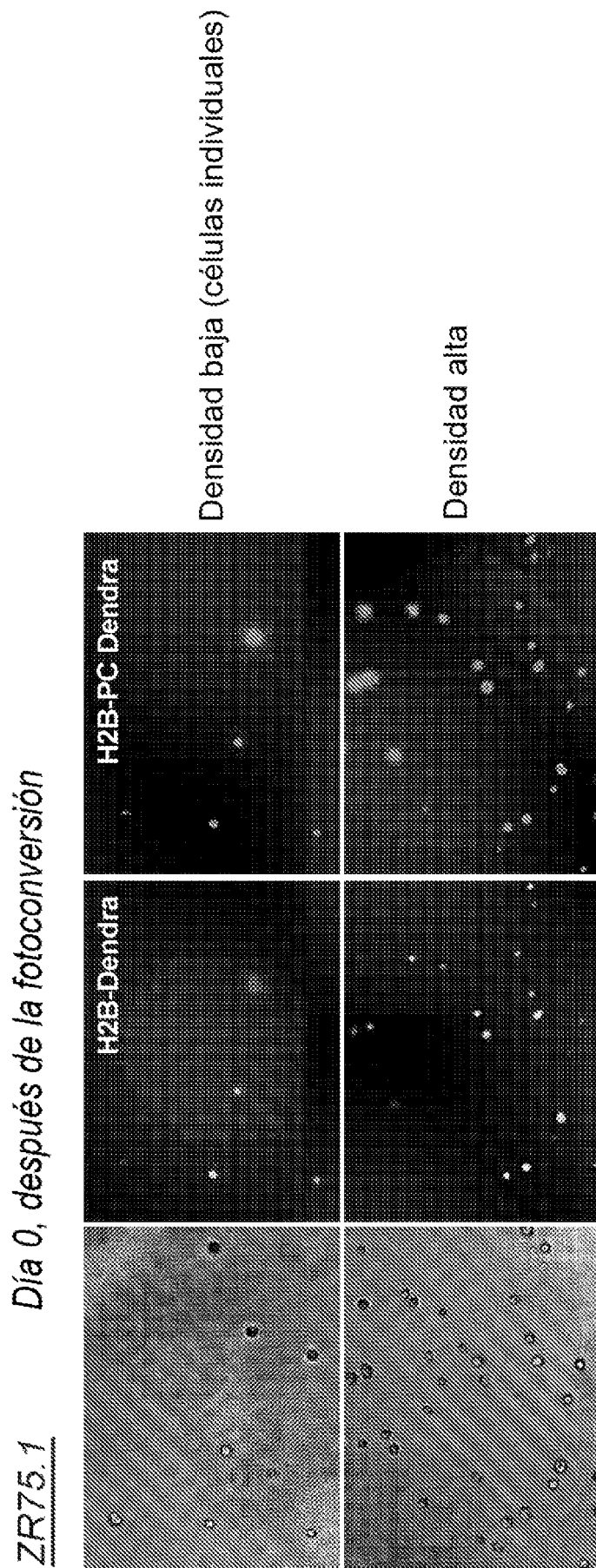


FIG. 4D

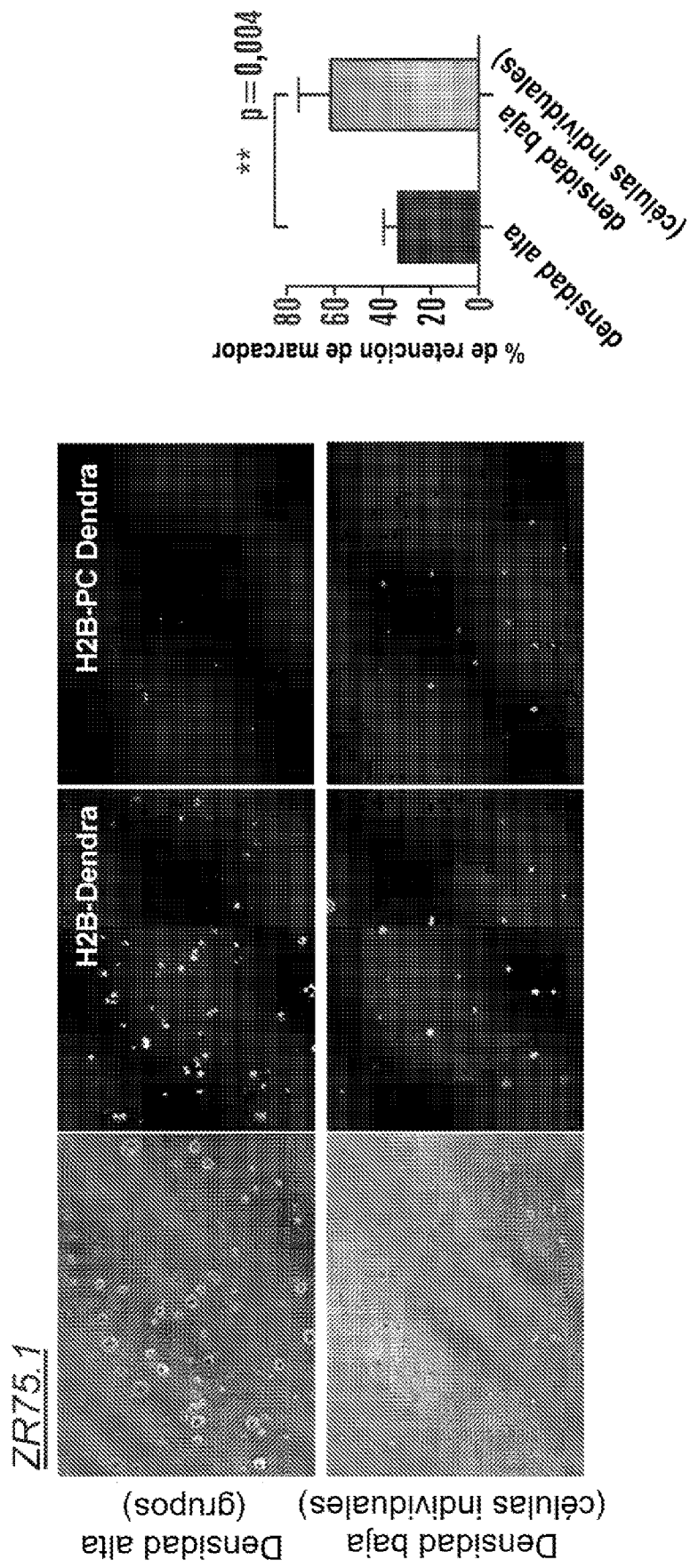


FIG. 4E

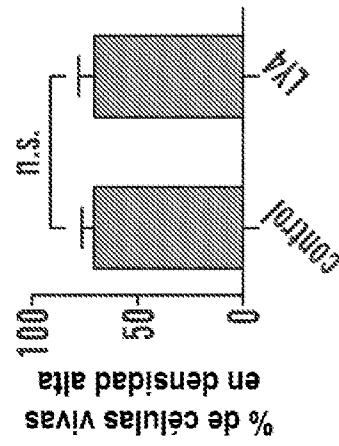
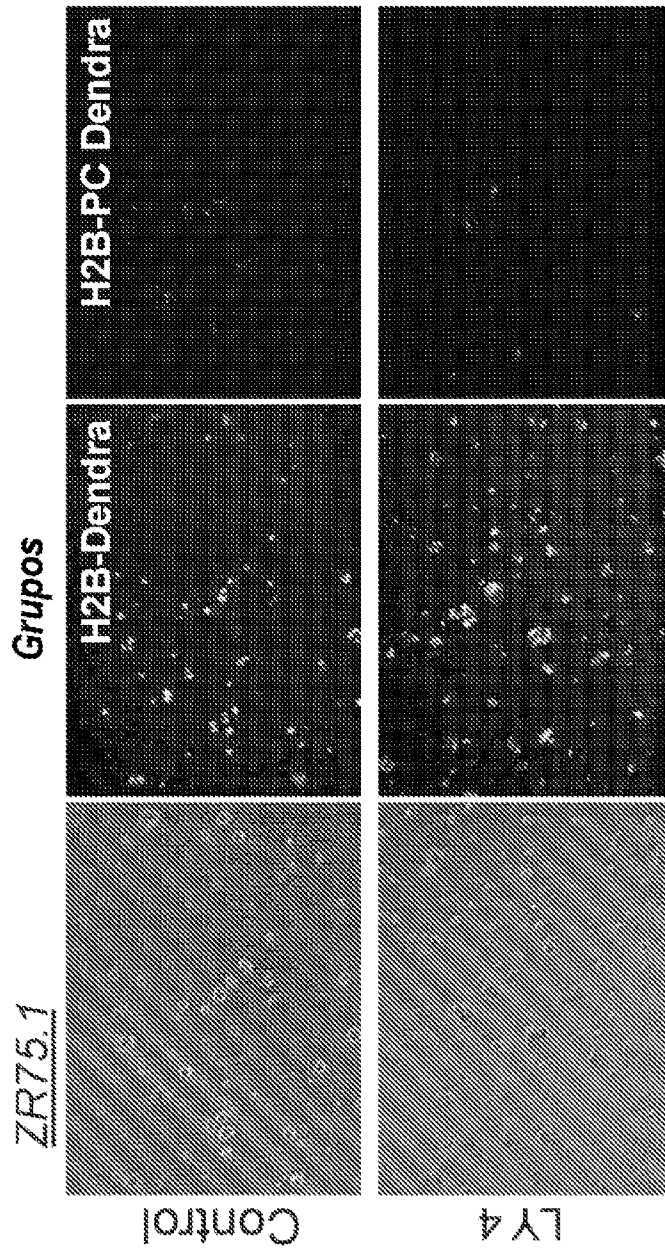


FIG. 4F

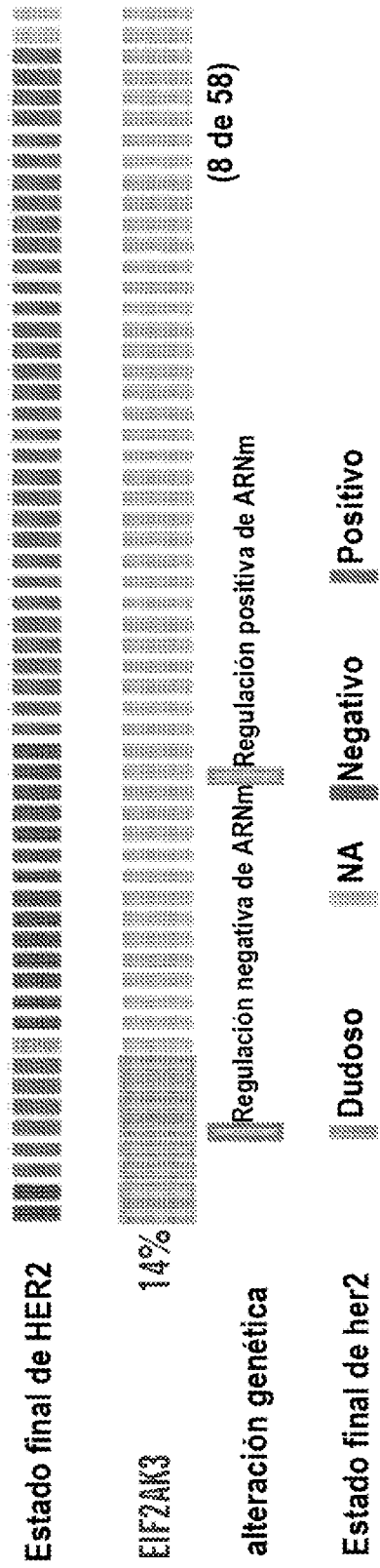


FIG. 5A

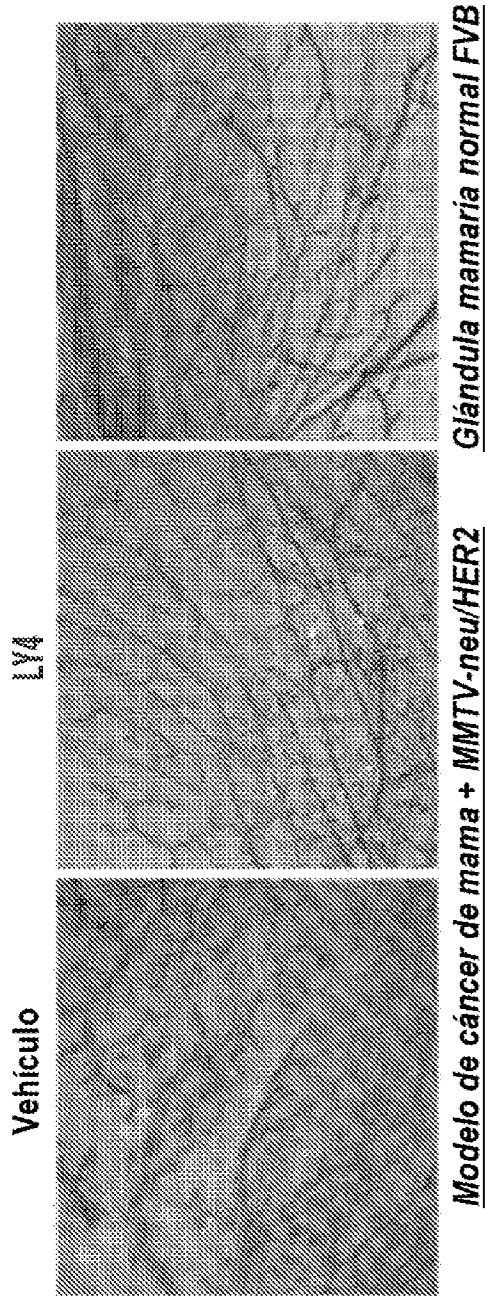


FIG. 5B

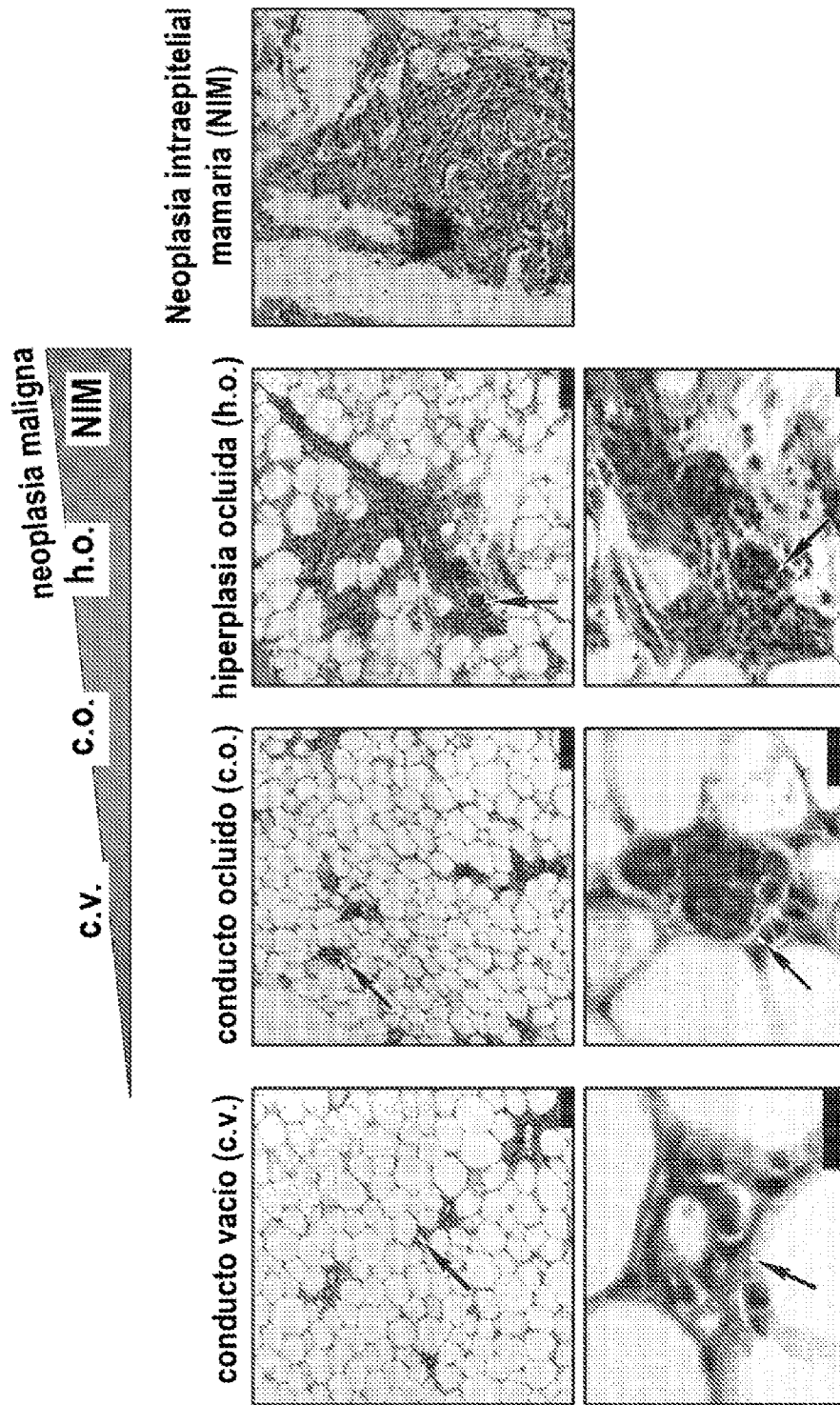


FIG. 5C

Modelo de cáncer de mama MMTV-neu/HER2⁺

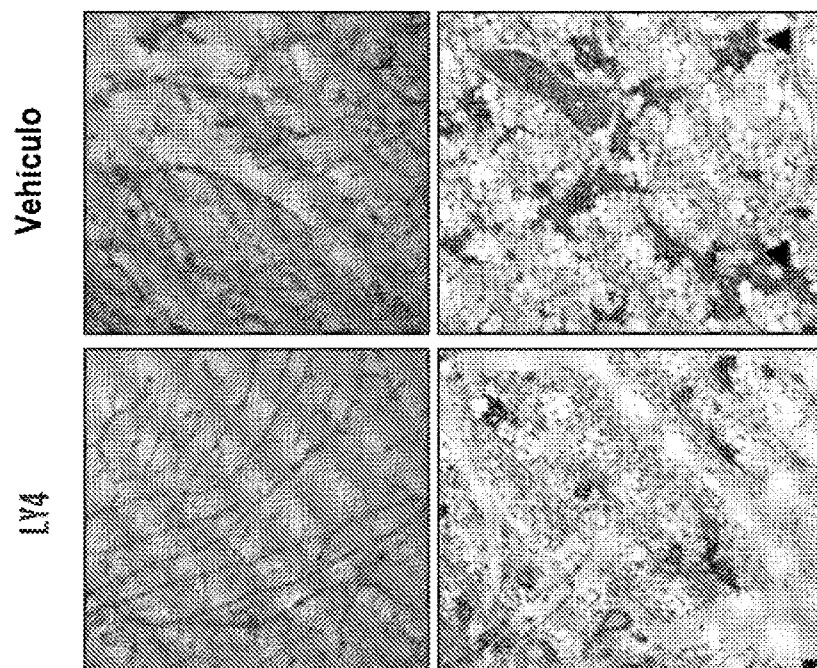


FIG. 6A

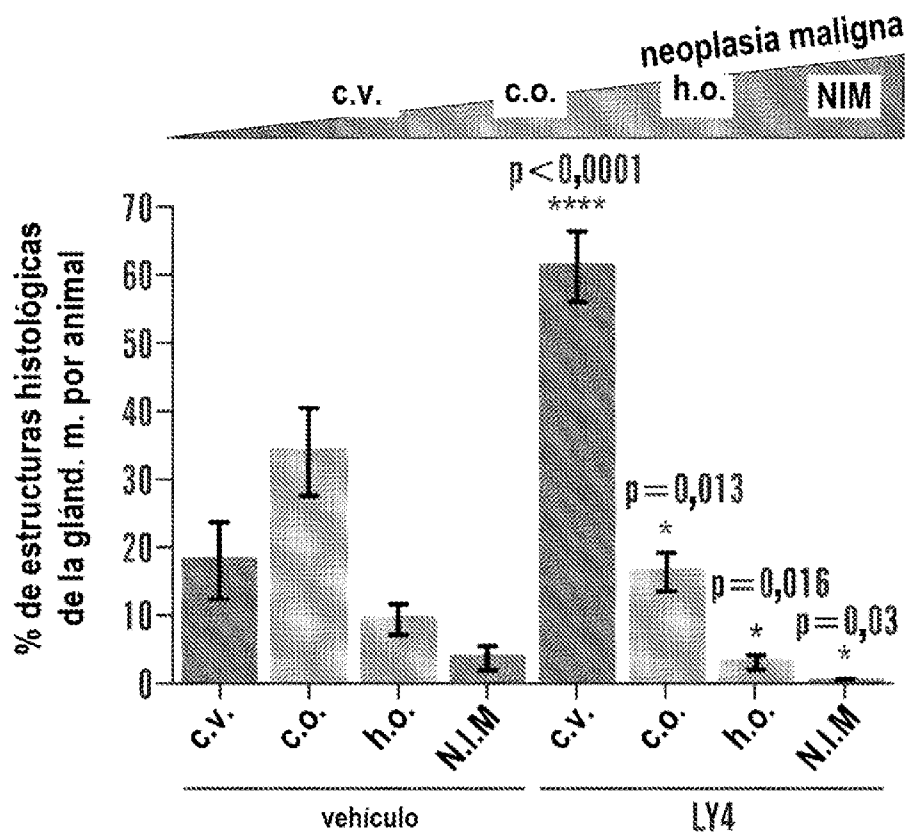
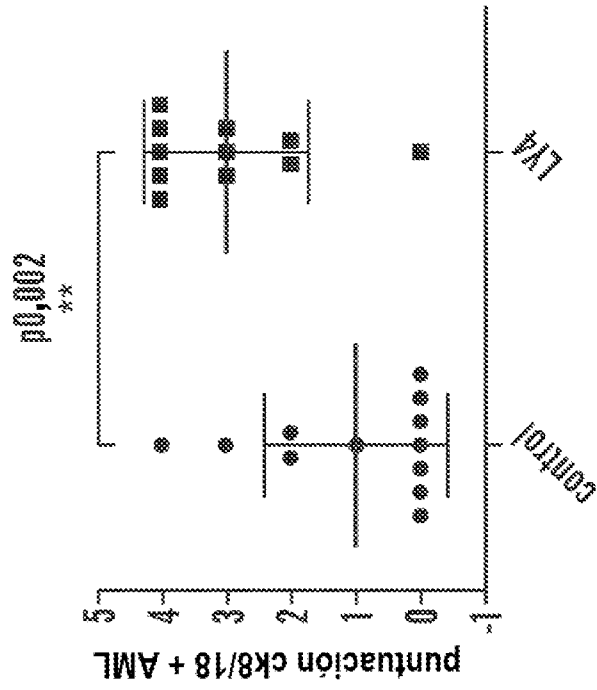


FIG. 6B



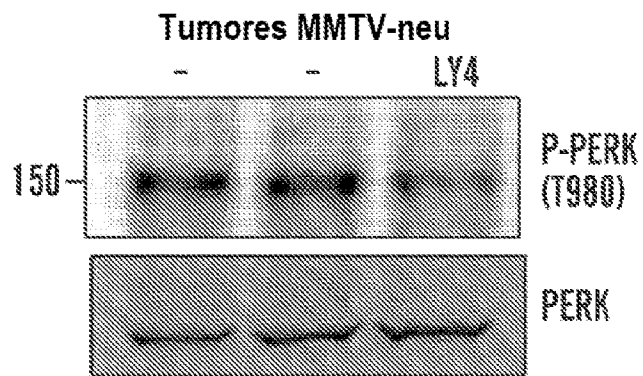


FIG. 7A

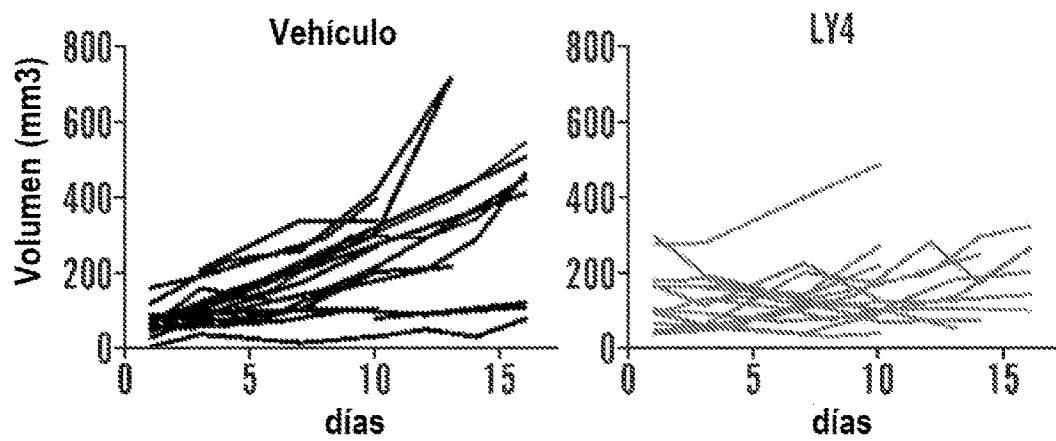


FIG. 7B

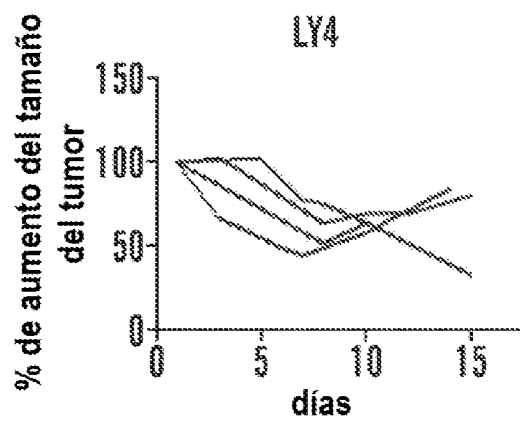


FIG. 7C

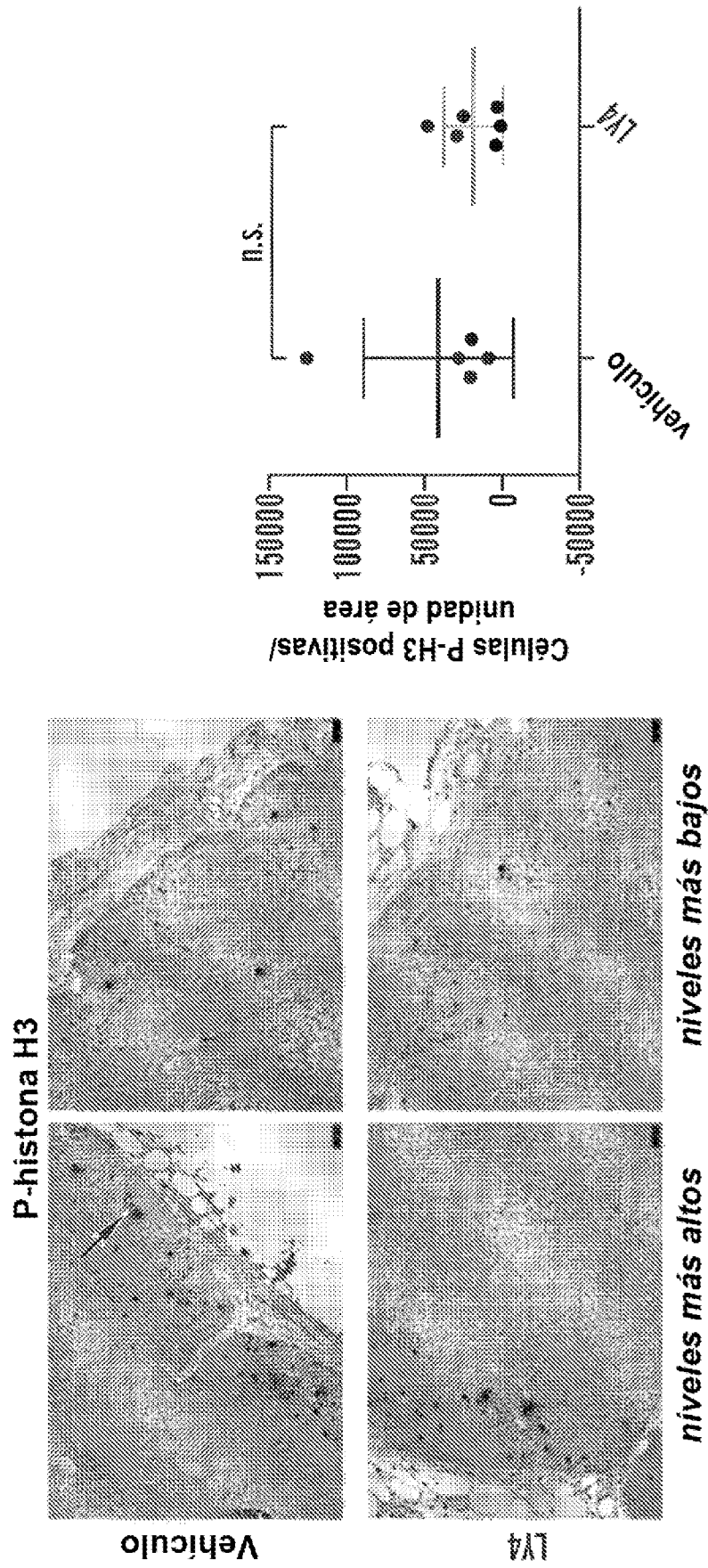
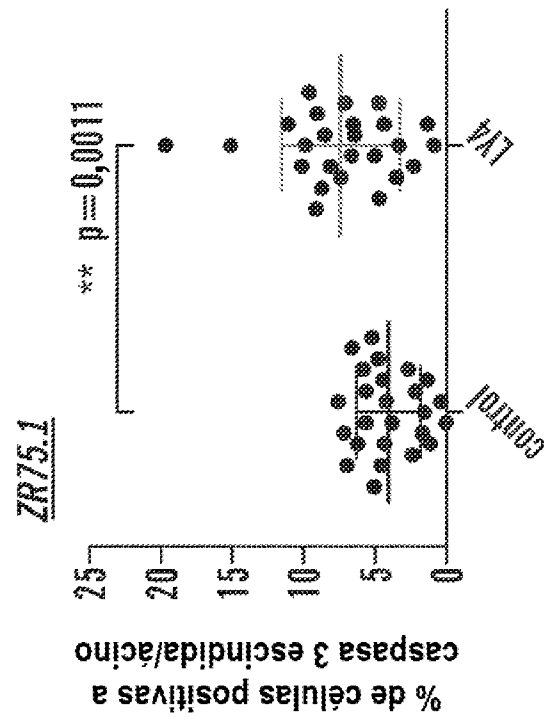
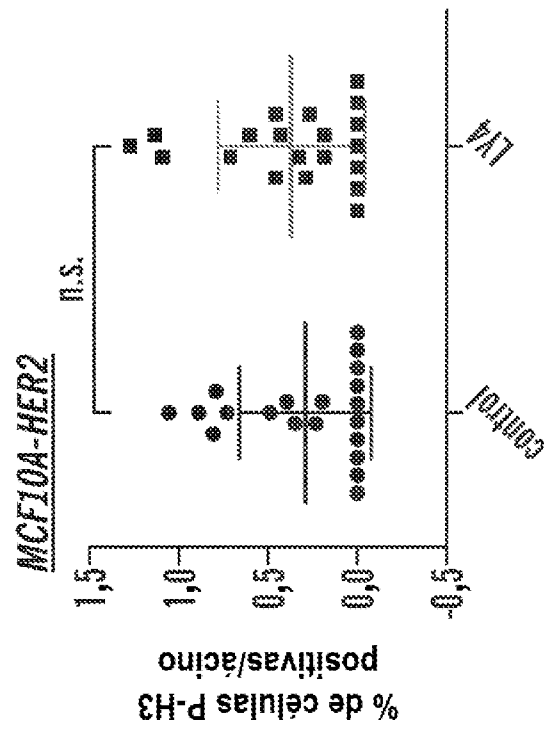


FIG. 7D



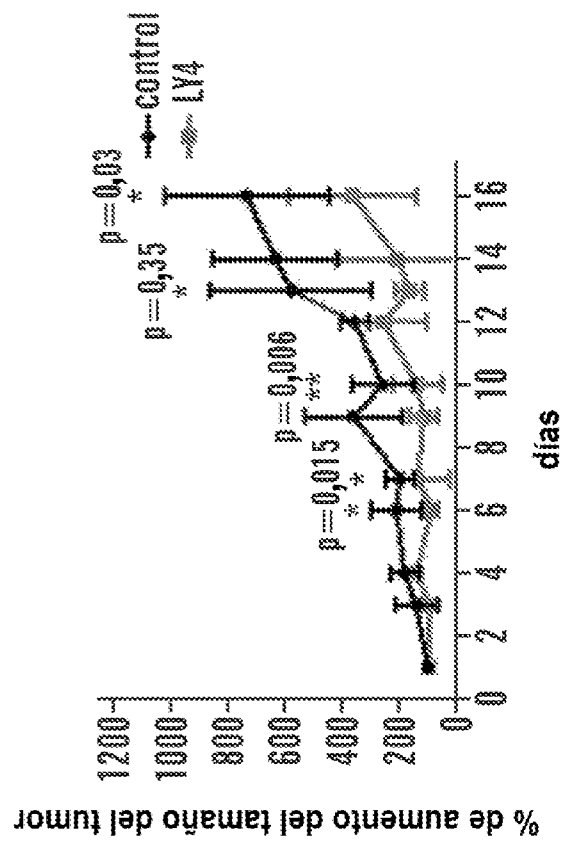


FIG. 8A

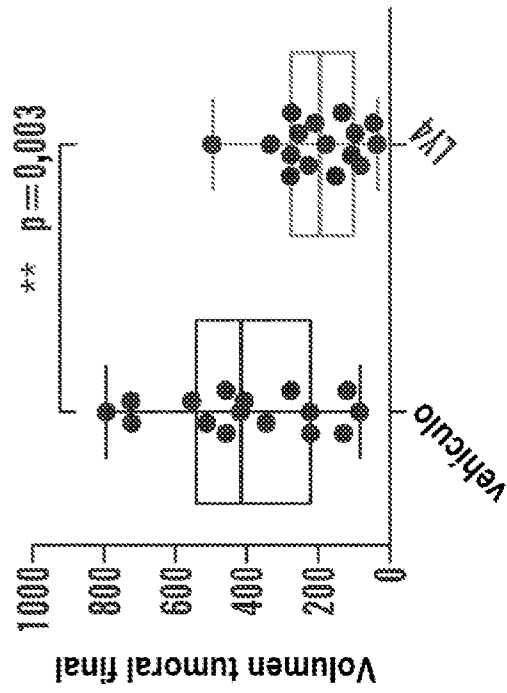


FIG. 8B

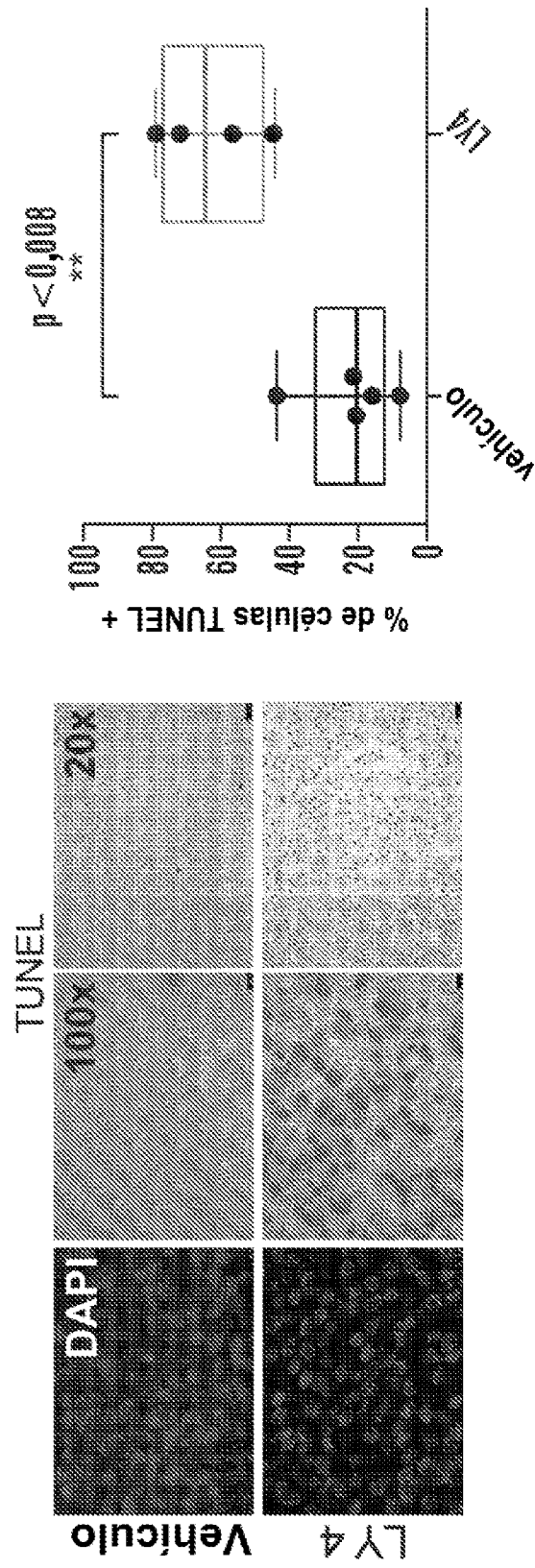


FIG. 8C

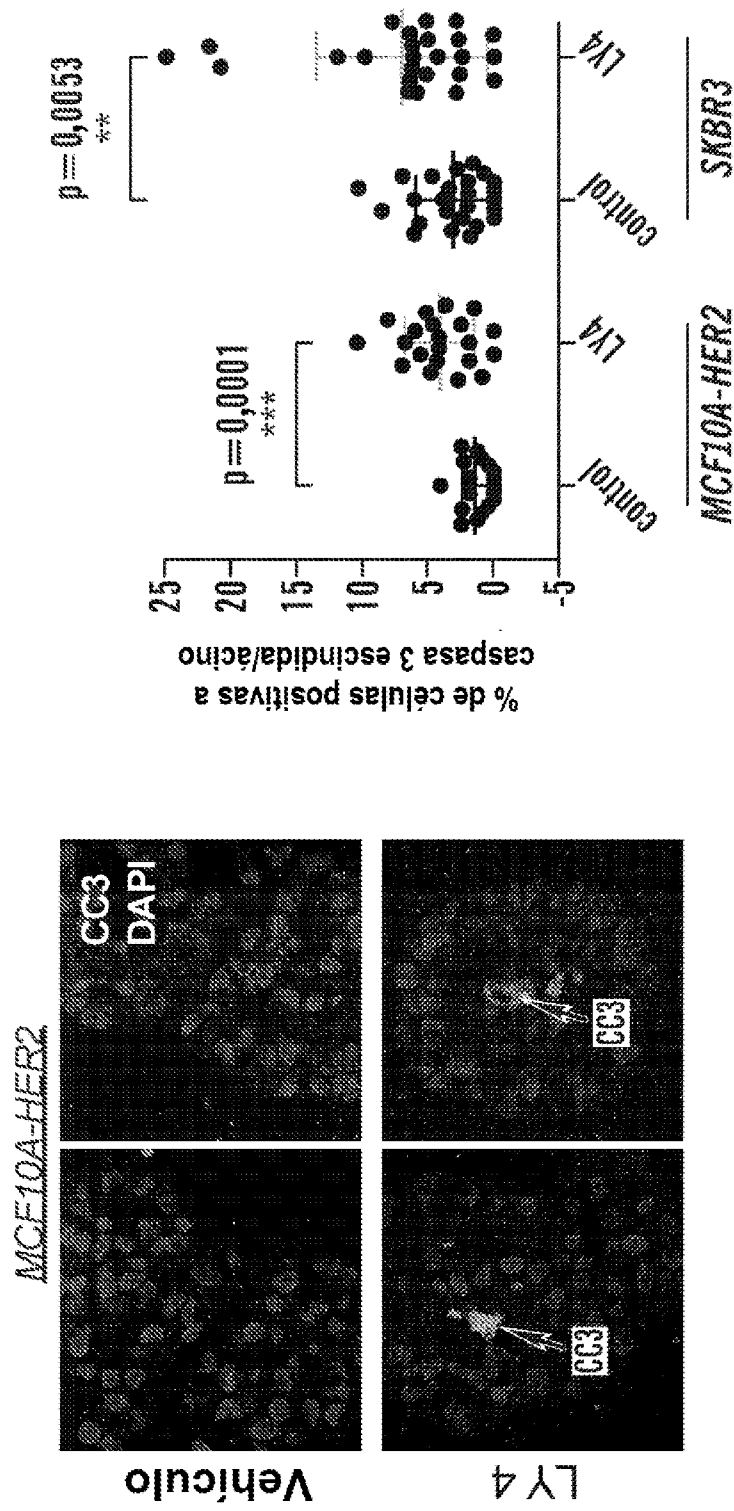


FIG. 8D

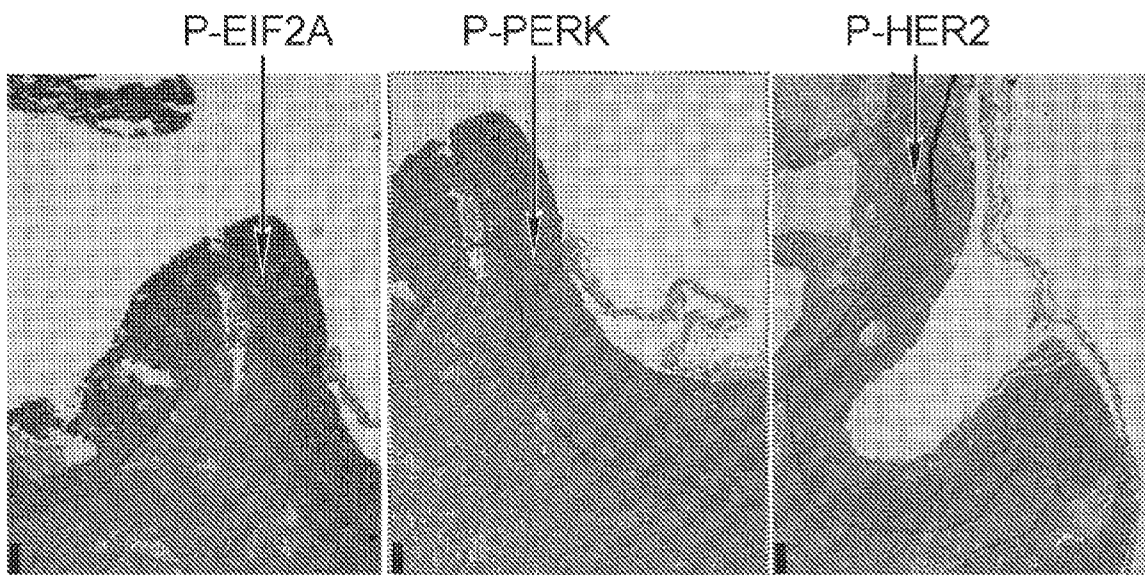
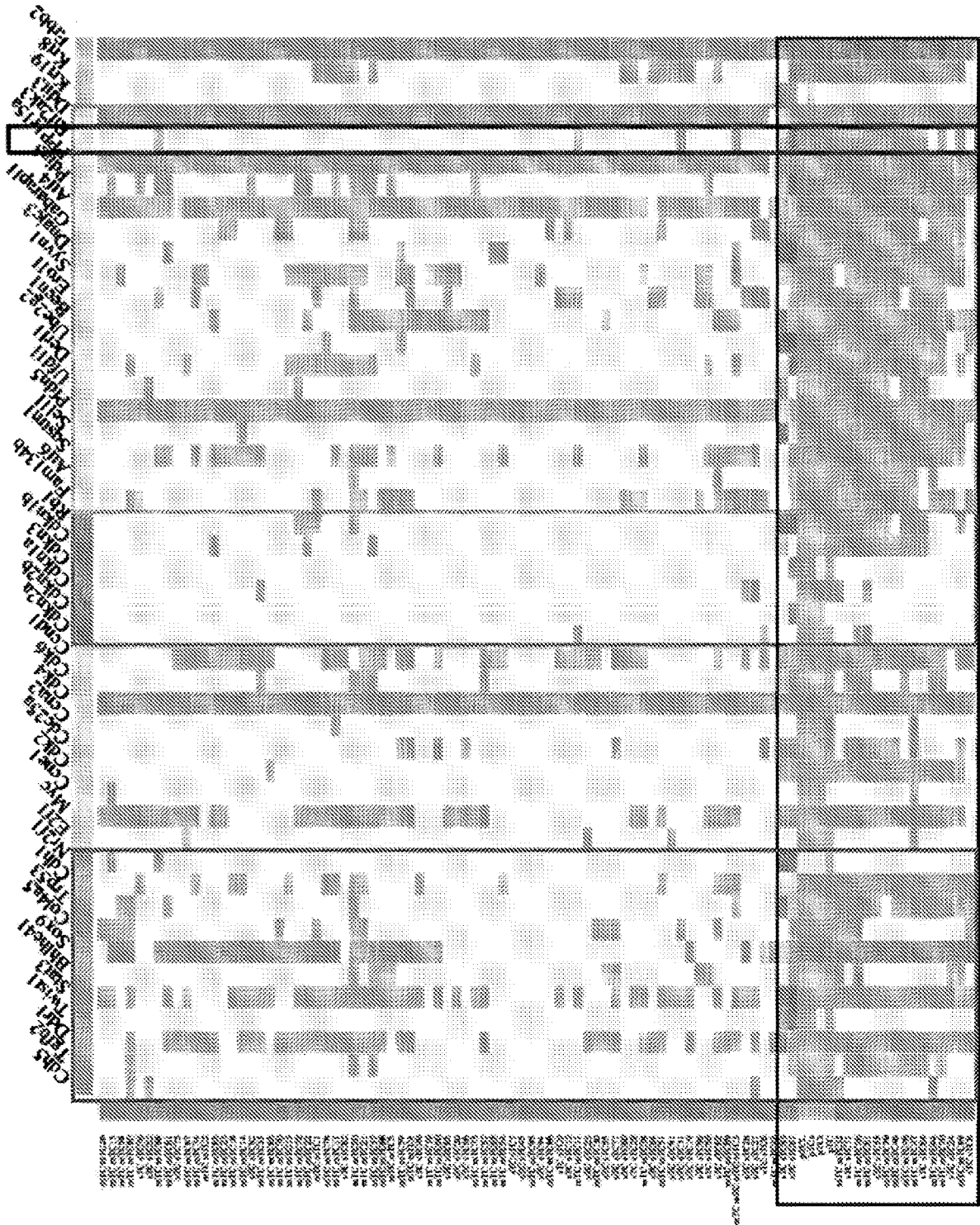


FIG. 9A



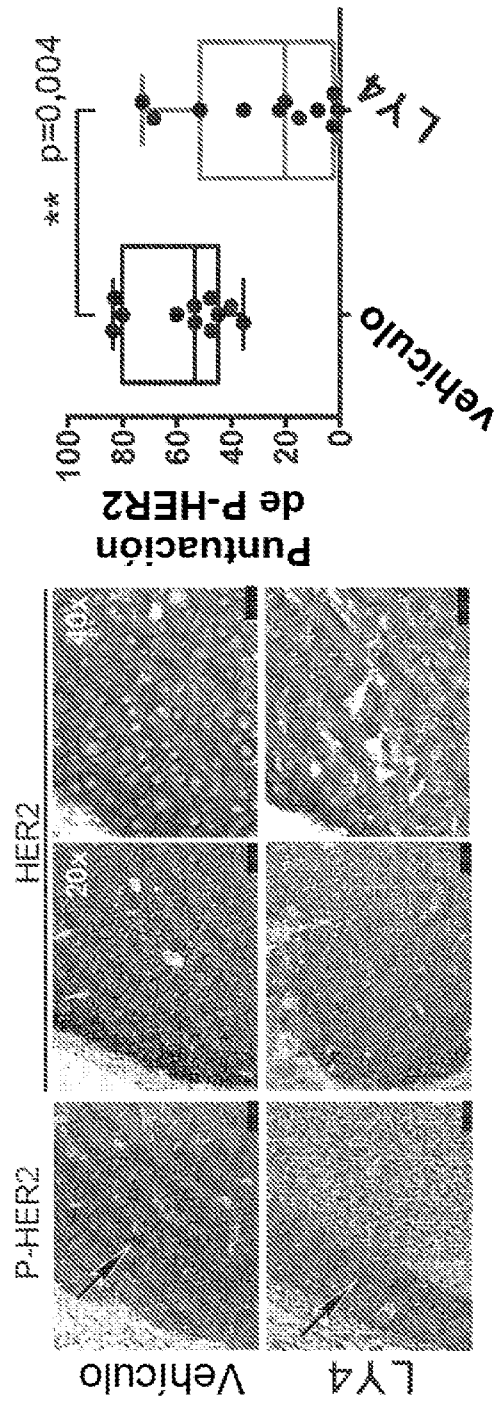


FIG. 9C

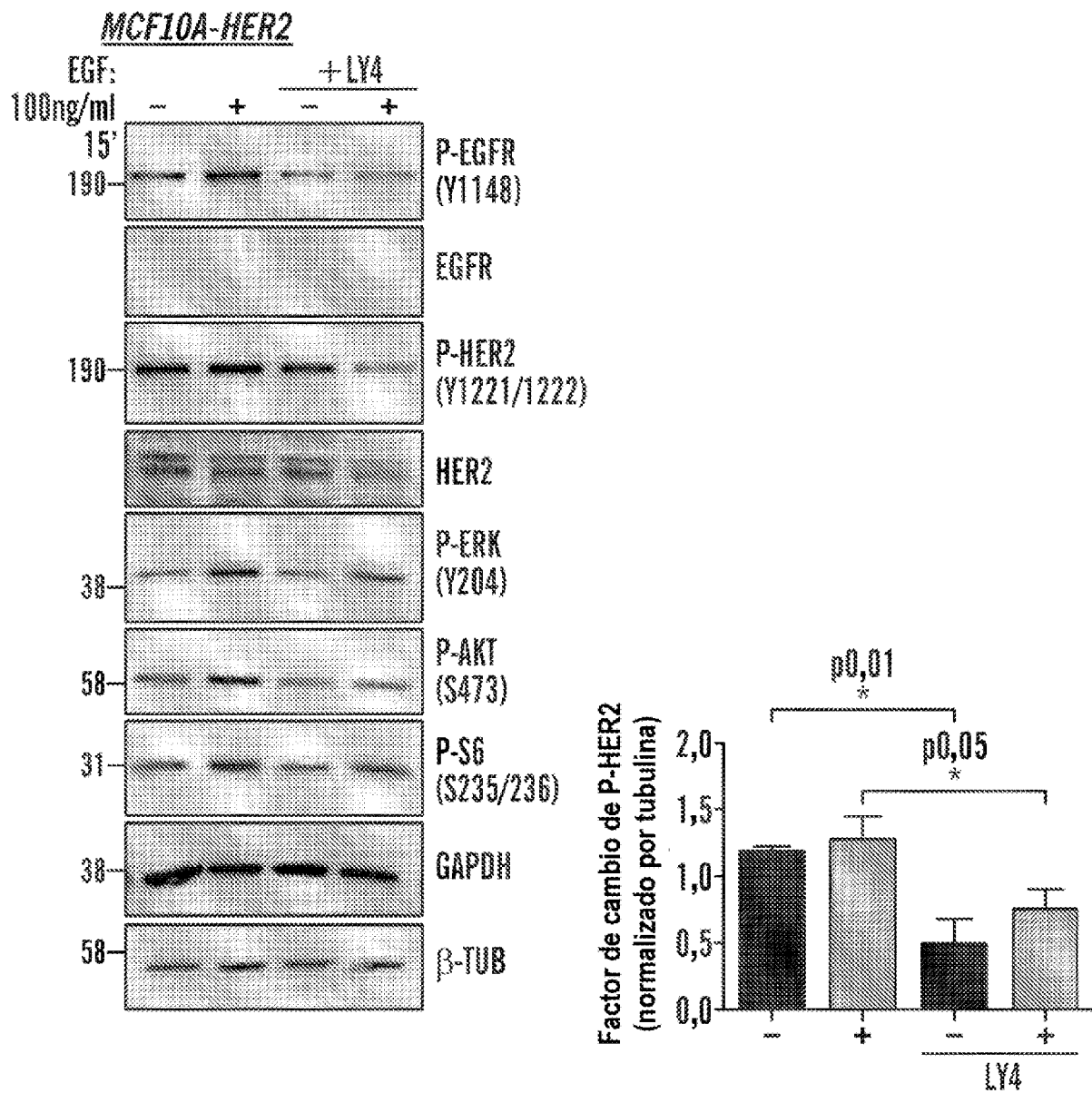
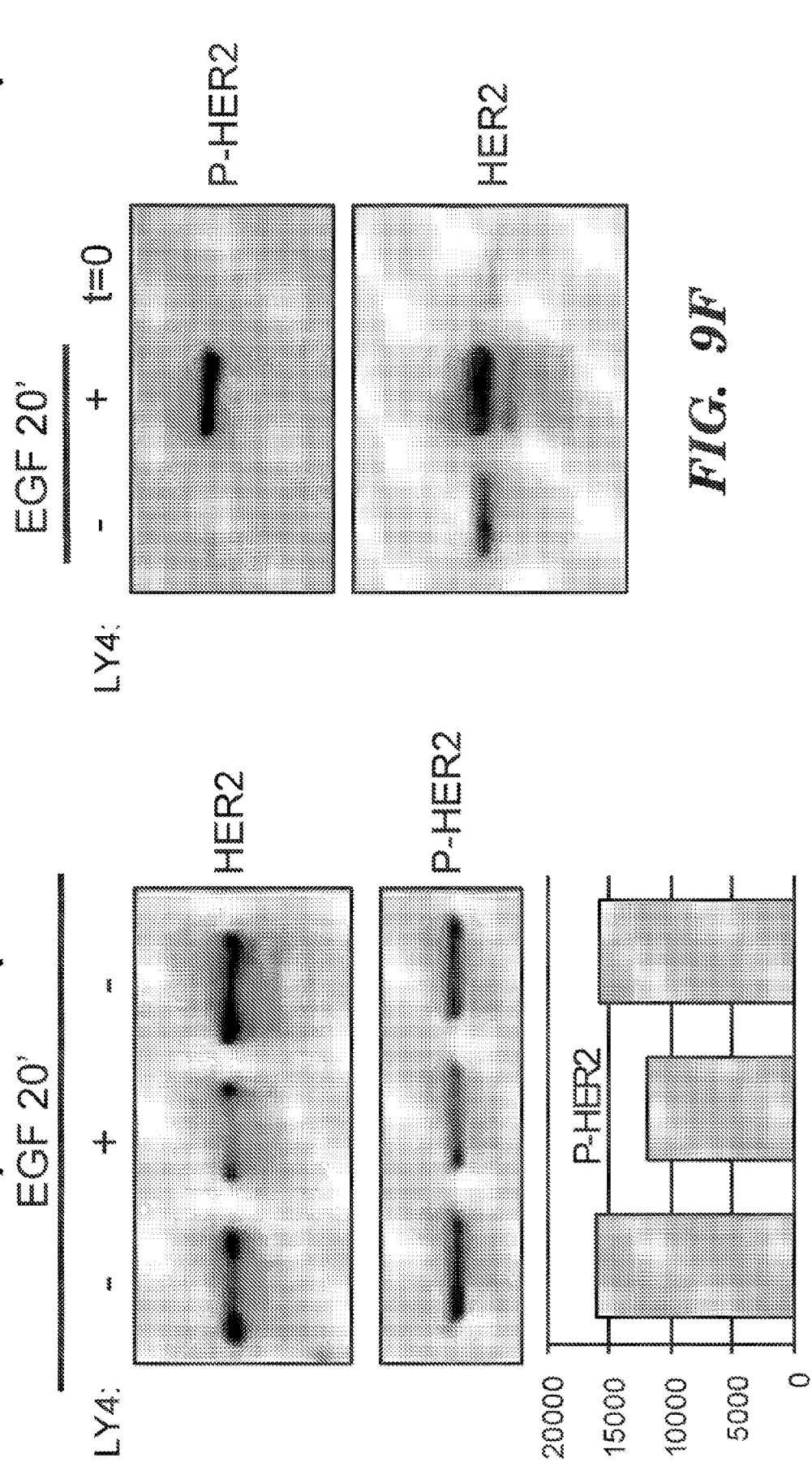


FIG. 9D

Receptor de superficie Niveles de endocitosis del receptor



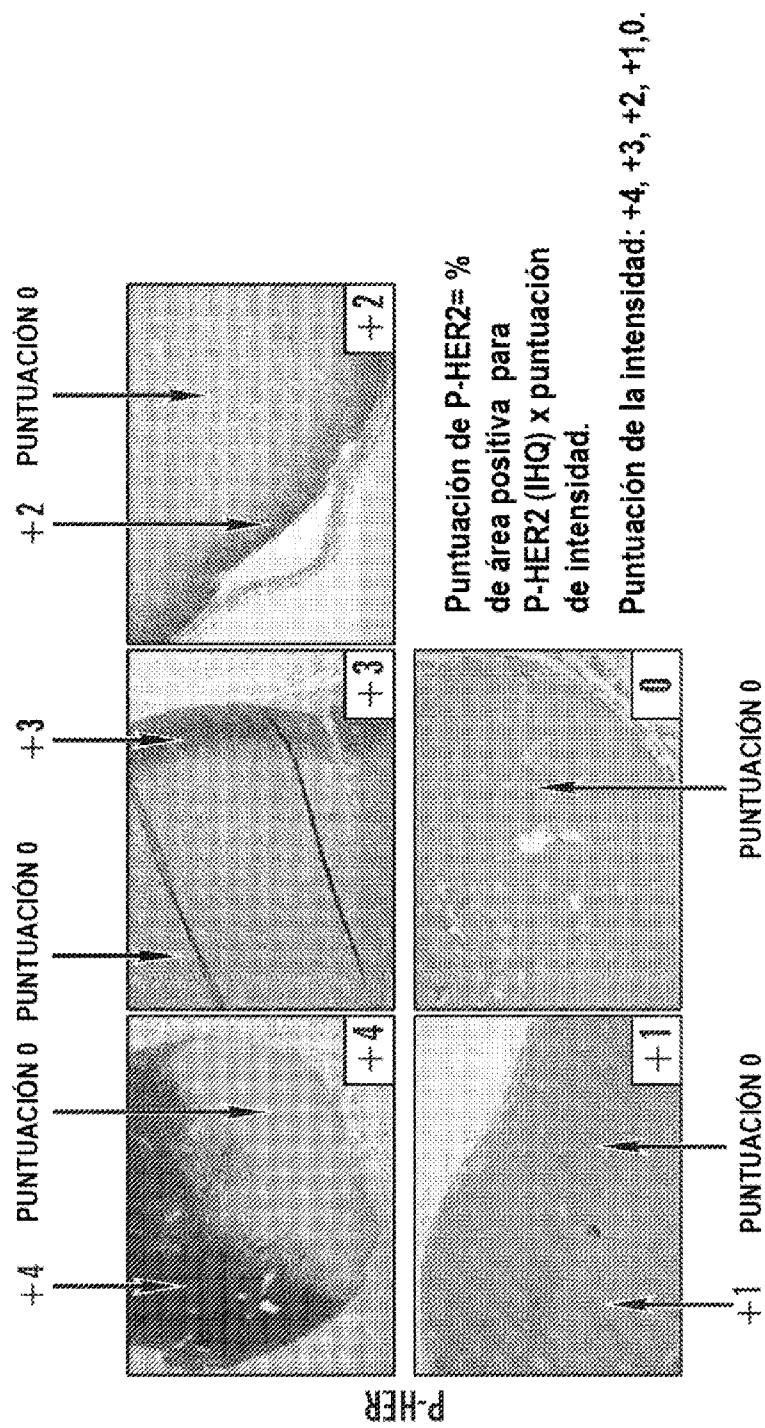
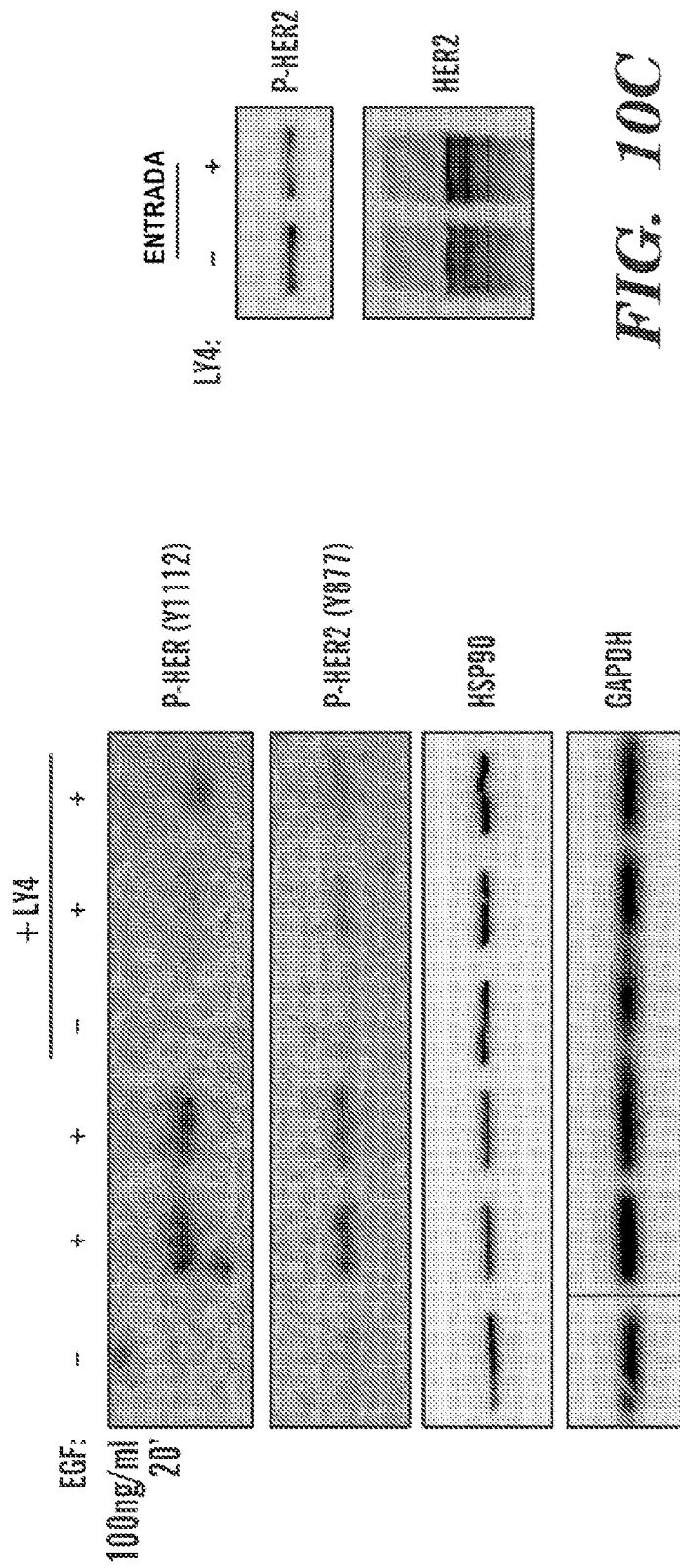


FIG. 10A



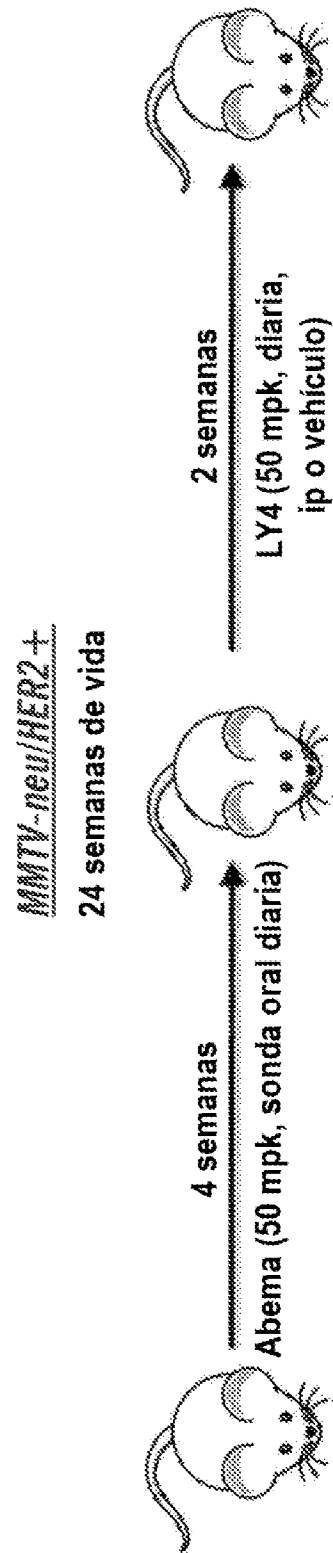


FIG. 11A

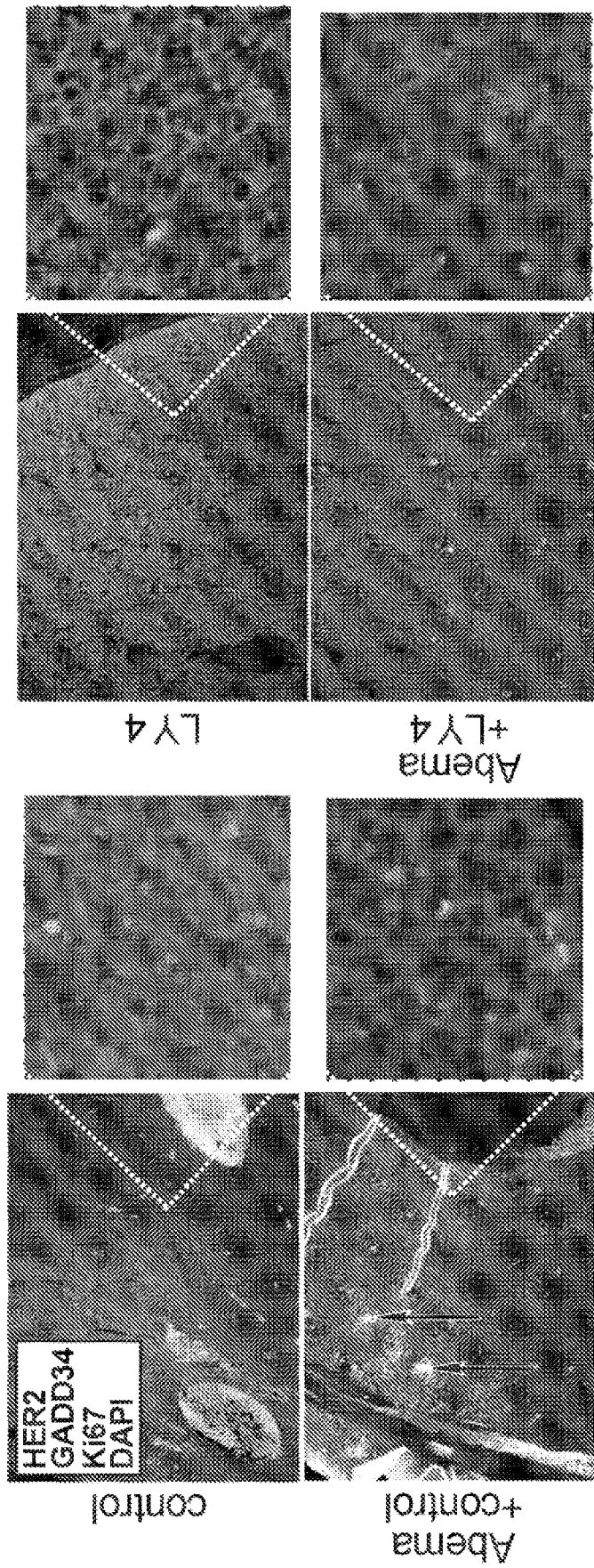


FIG. 11B

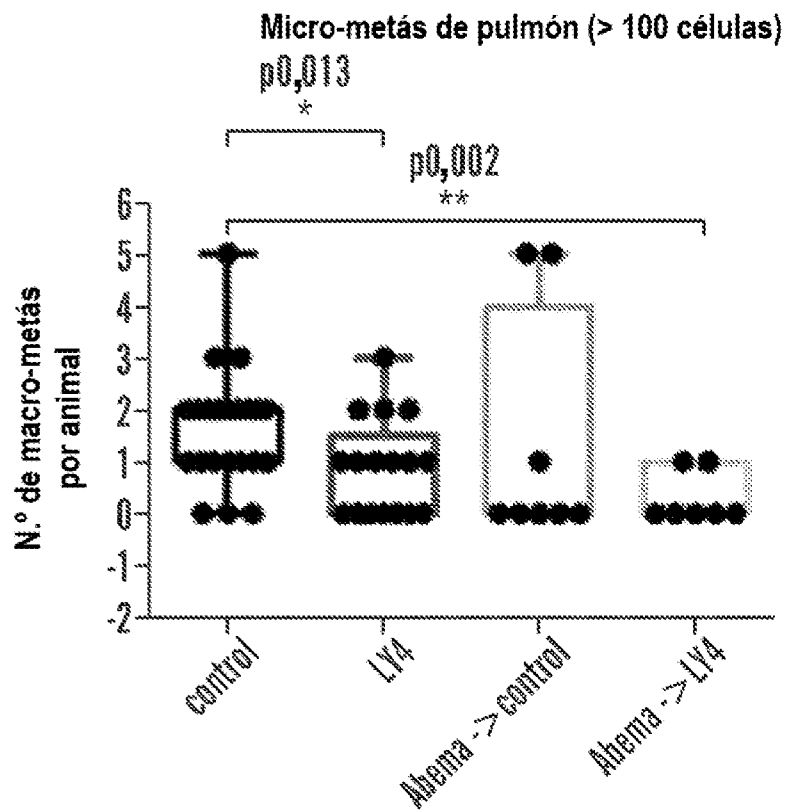


FIG. 11C

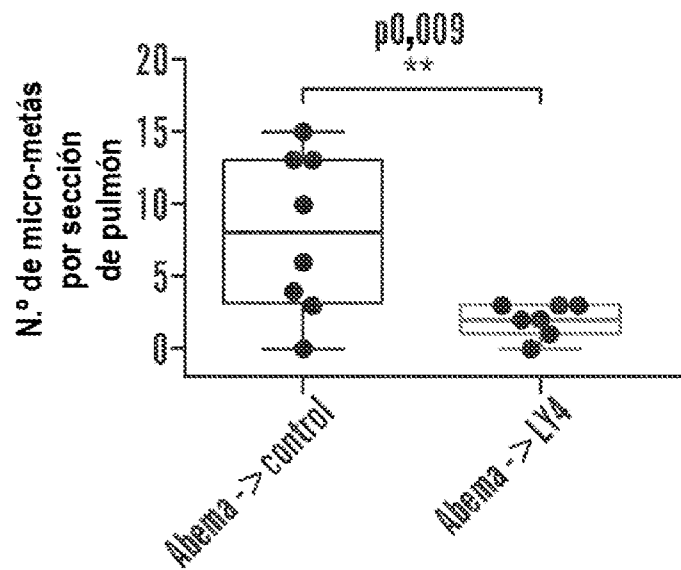
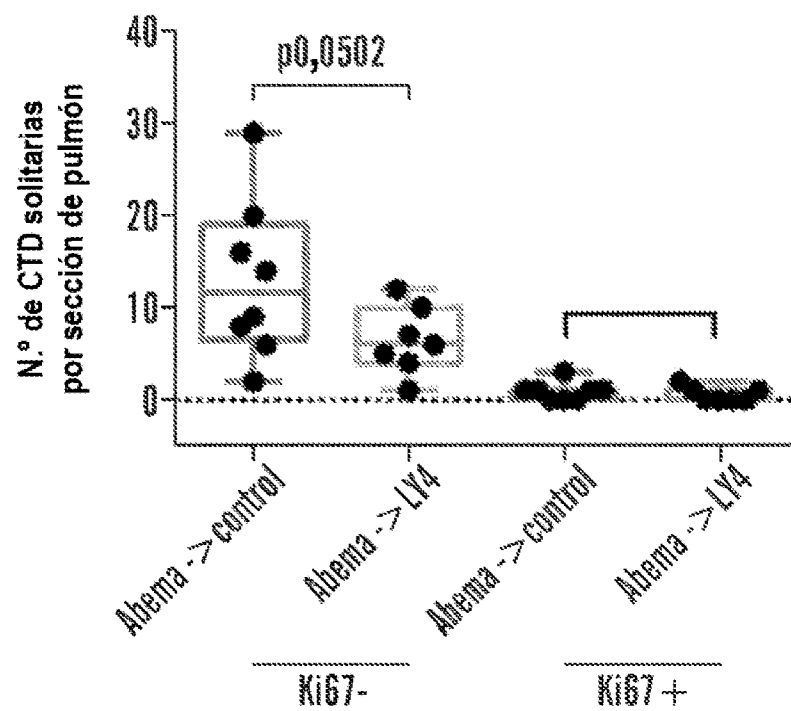


FIG. 11D

**FIG. 11E**

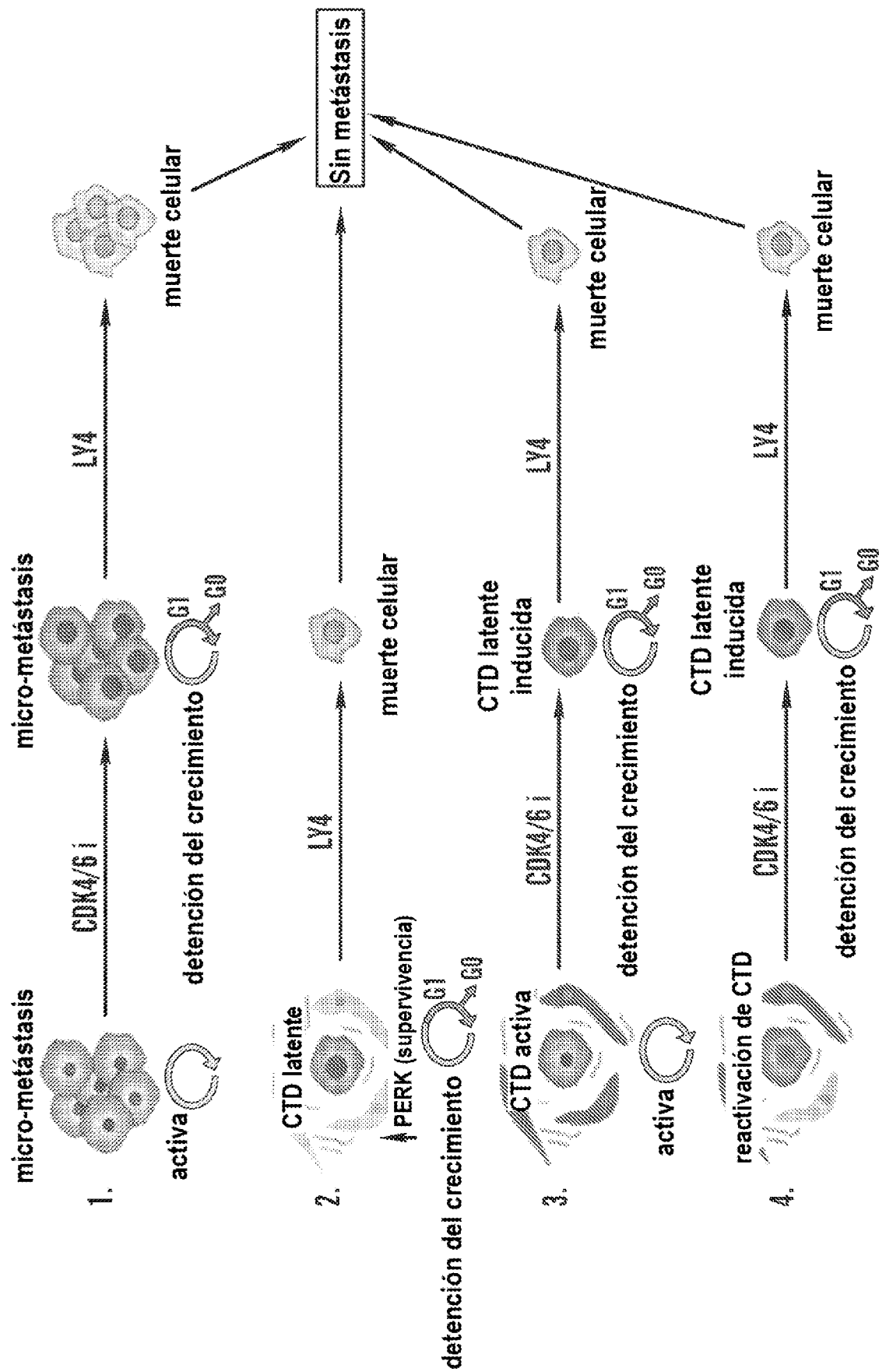


FIG. 12A

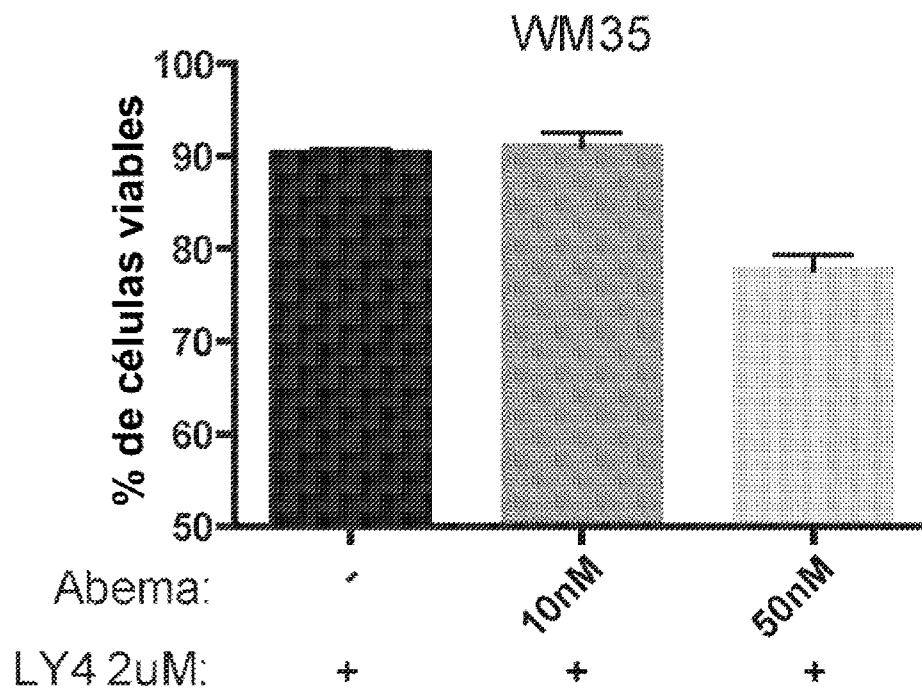


FIG. 12B

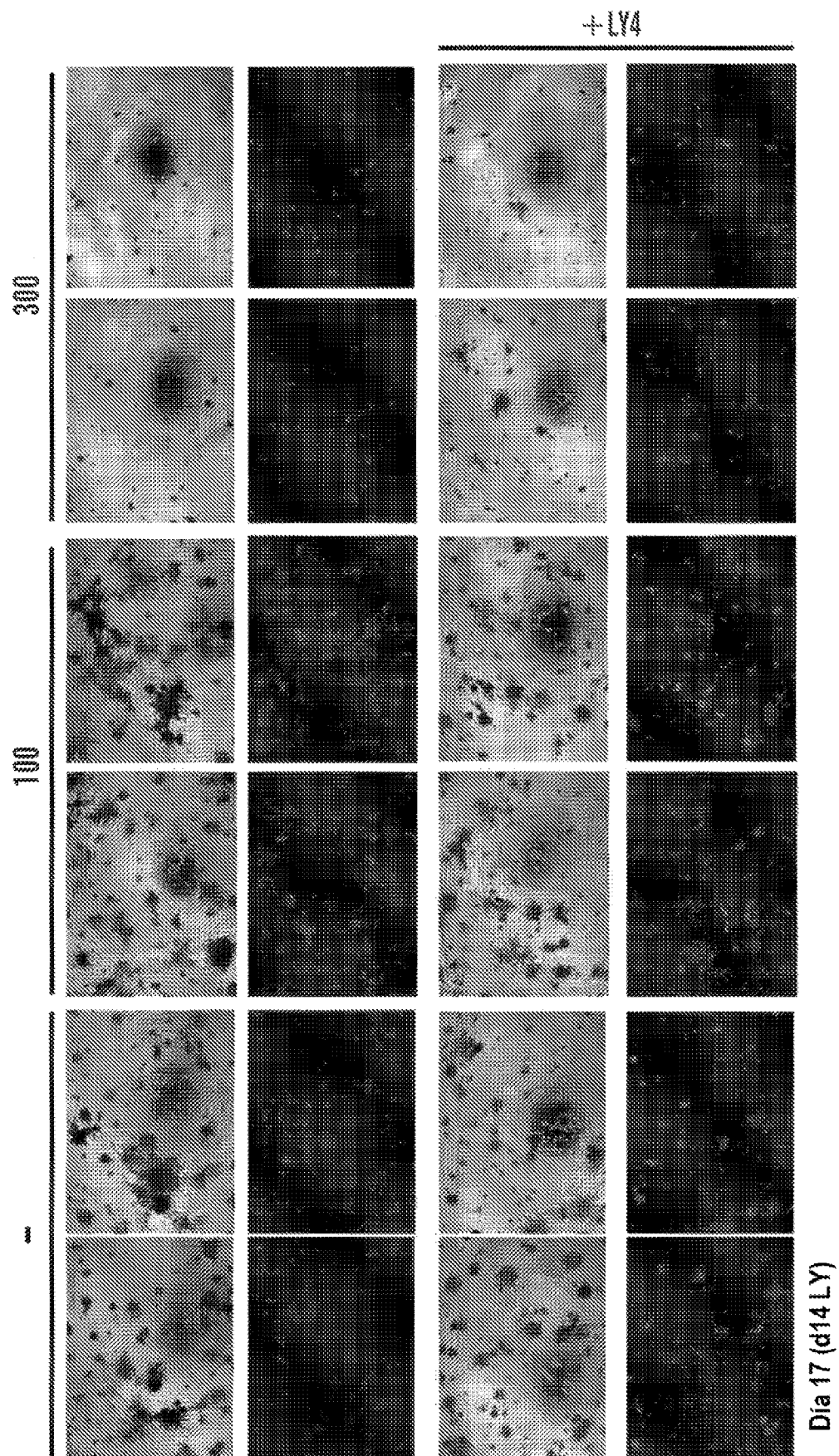


FIG. 12C

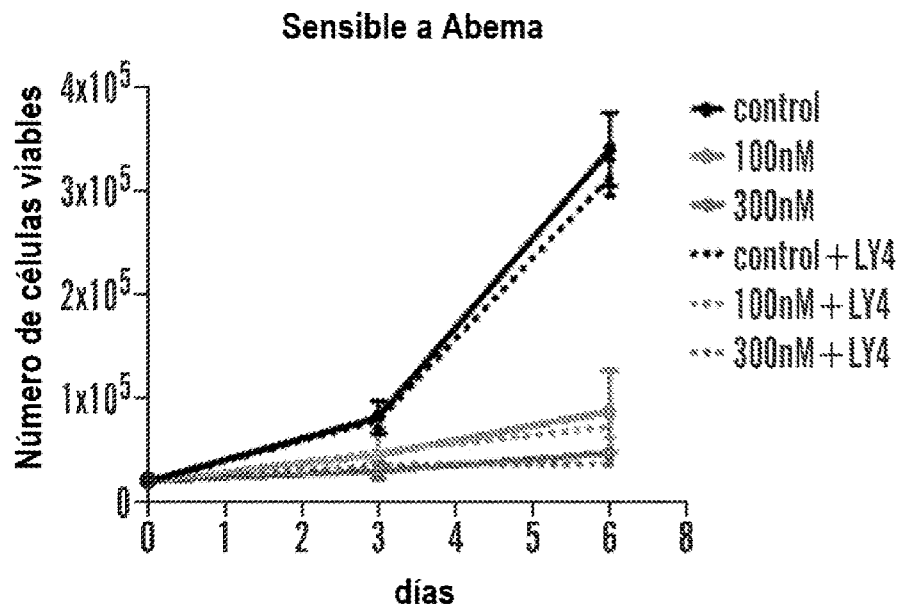


FIG. 12D

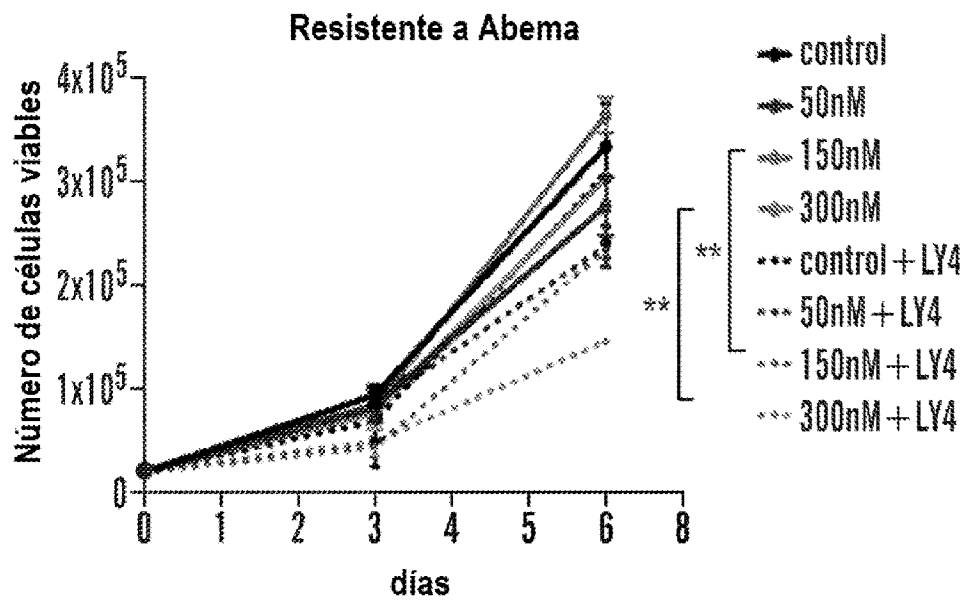


FIG. 12E

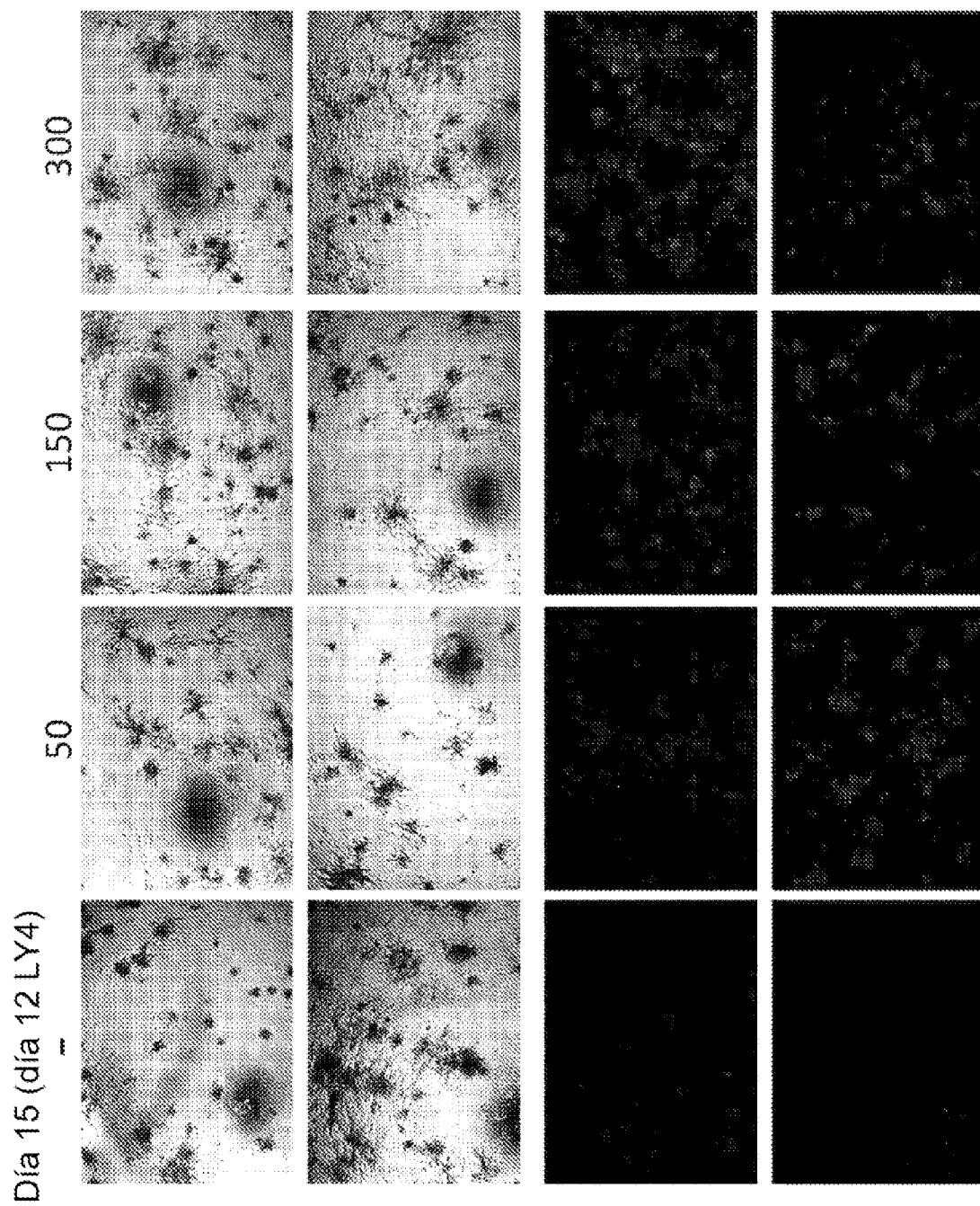


FIG. 12F

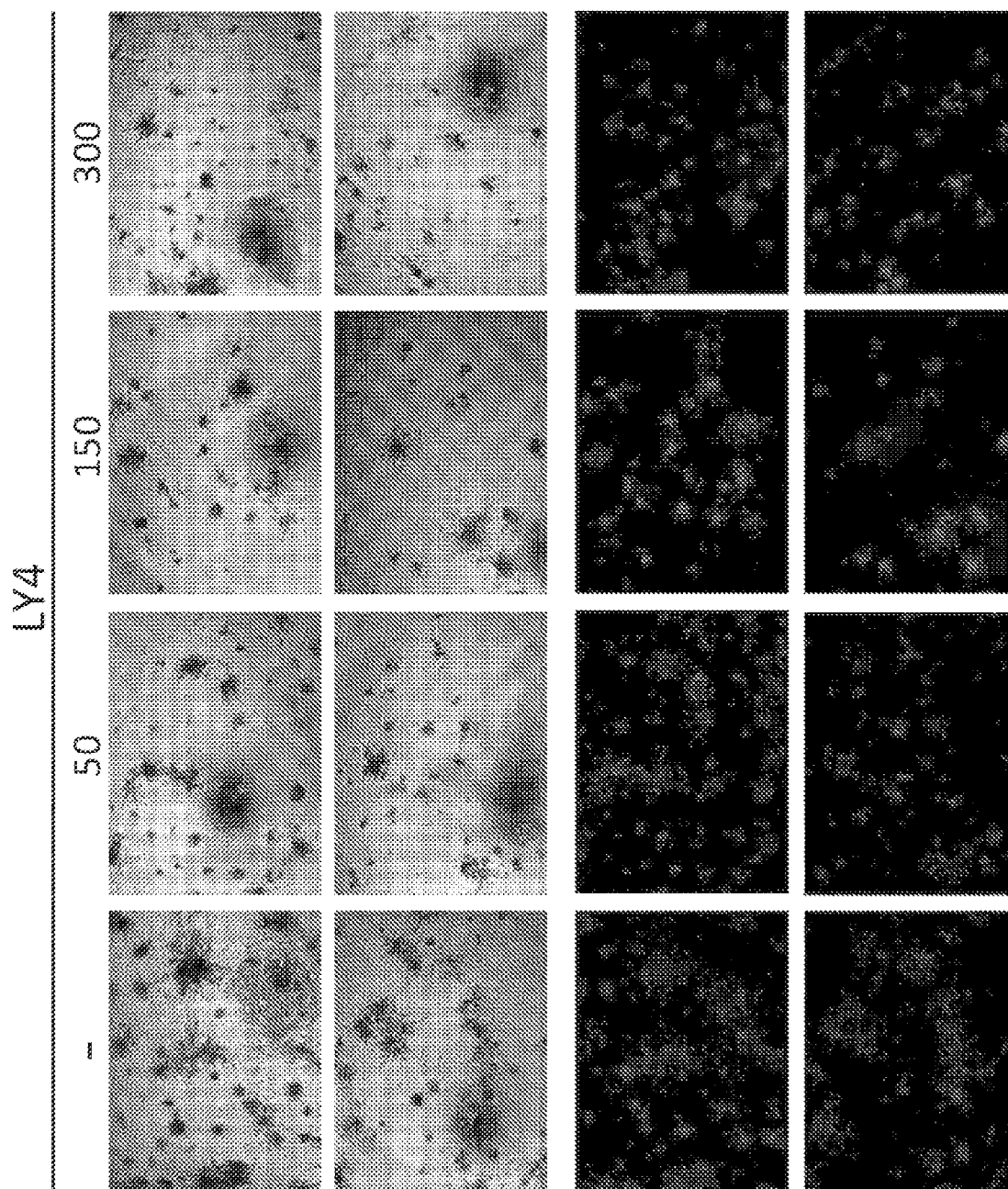


FIG. 12F (cont.)

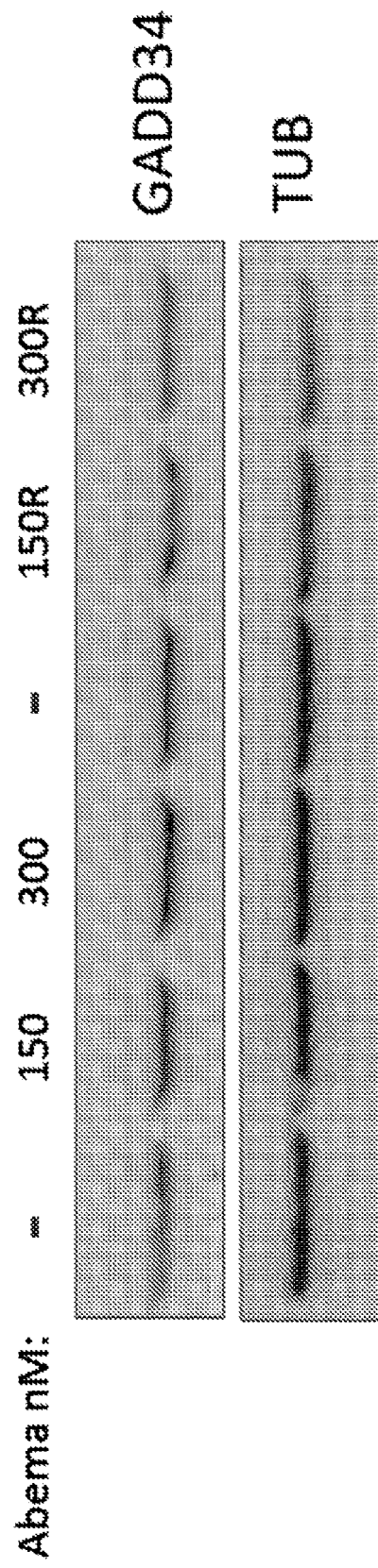


FIG. 12G

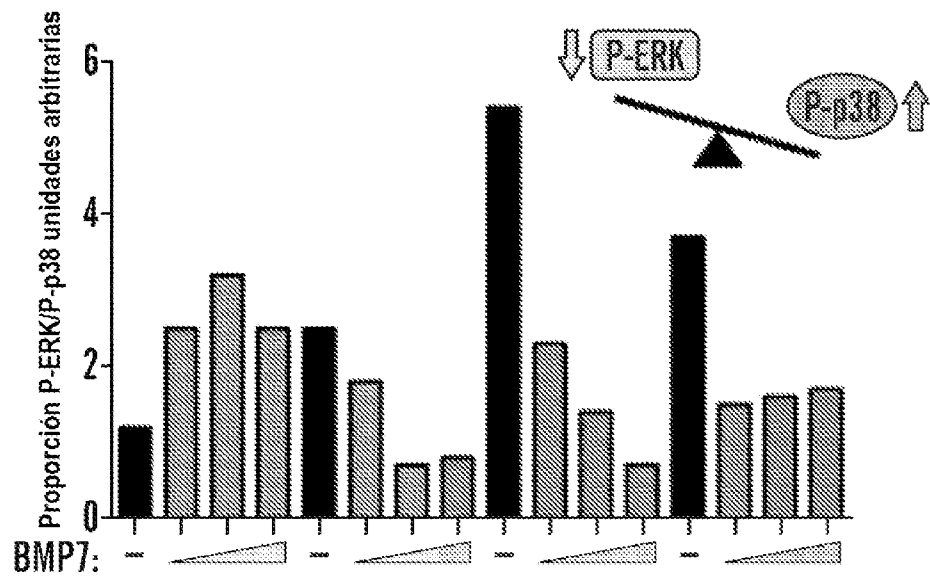


FIG. 13A

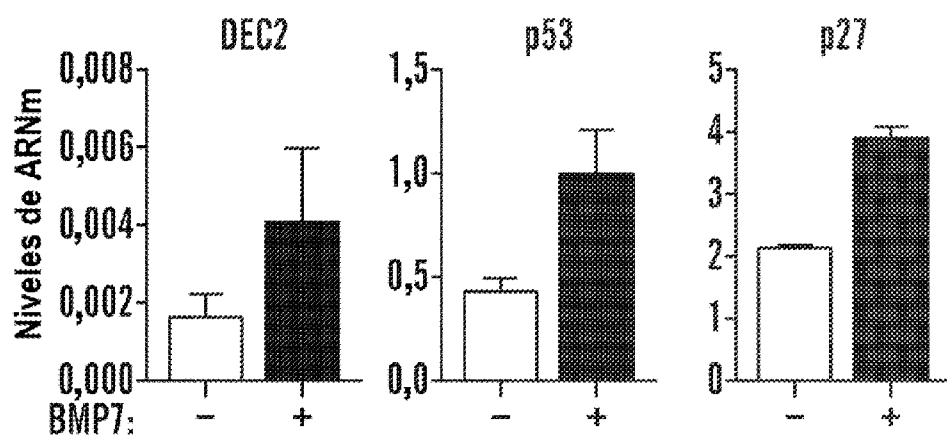


FIG. 13B

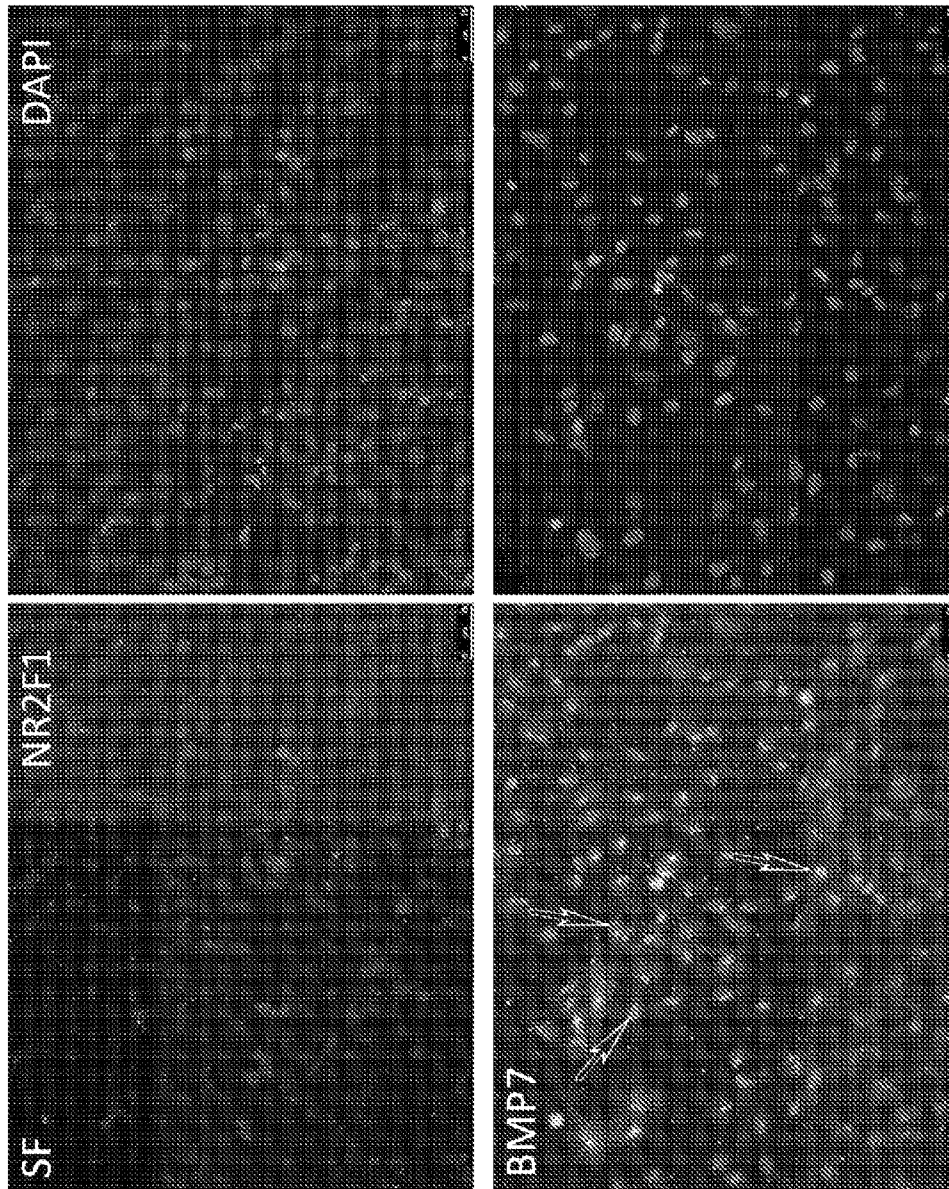


FIG. 13C

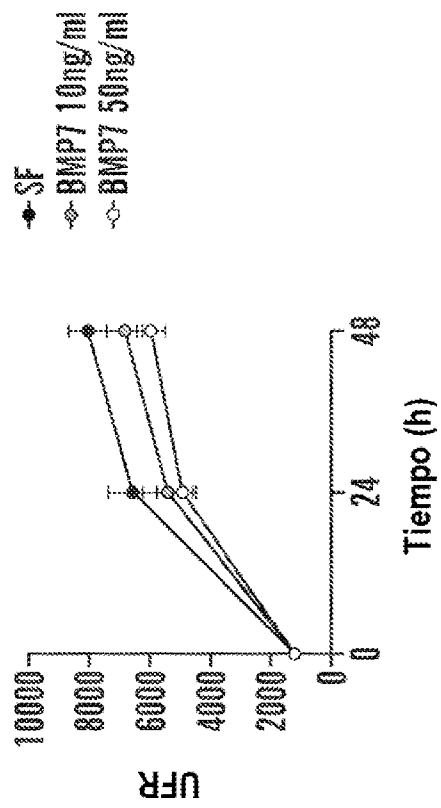


FIG. 14A

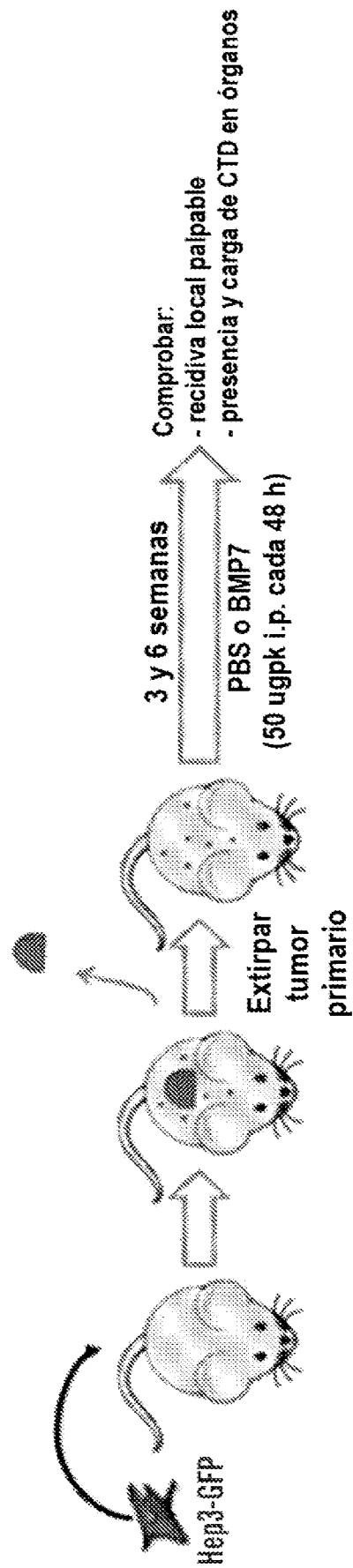


FIG. 14B

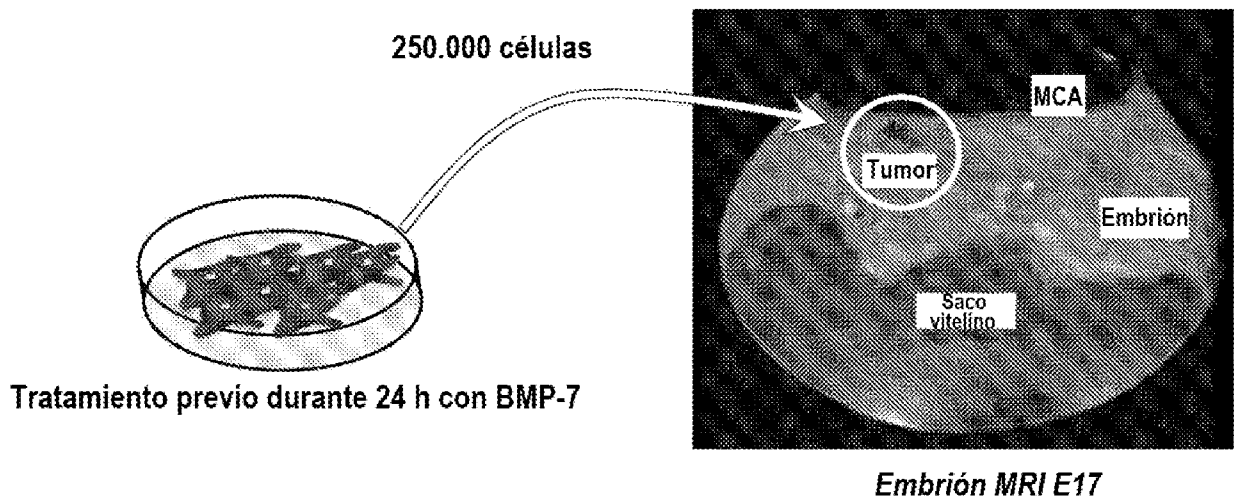


FIG. 14C

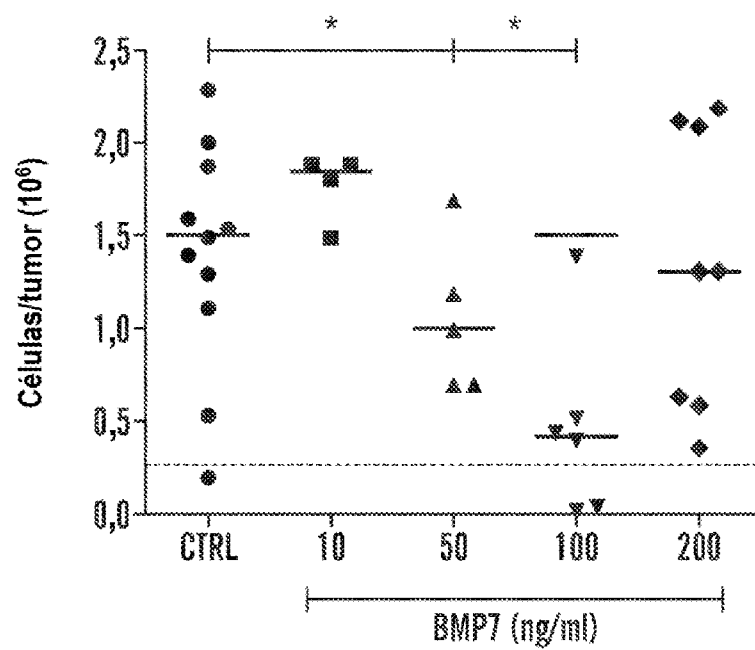


FIG. 14D

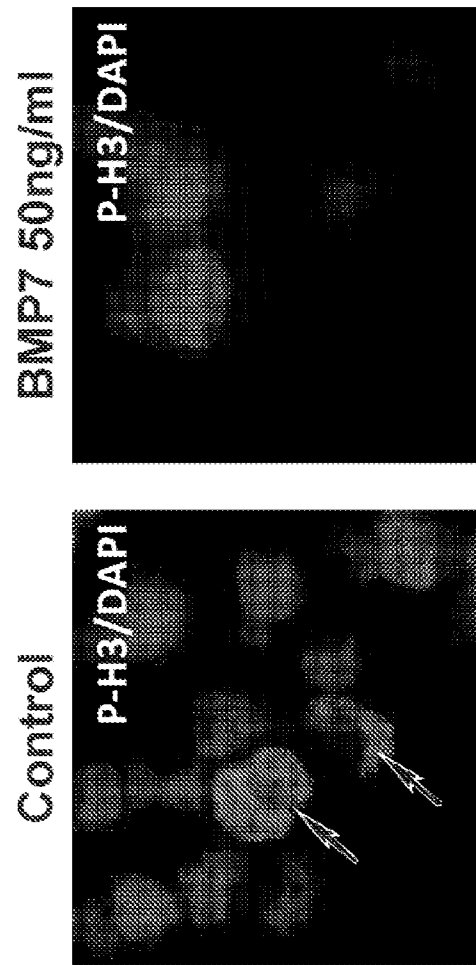


FIG. 14E

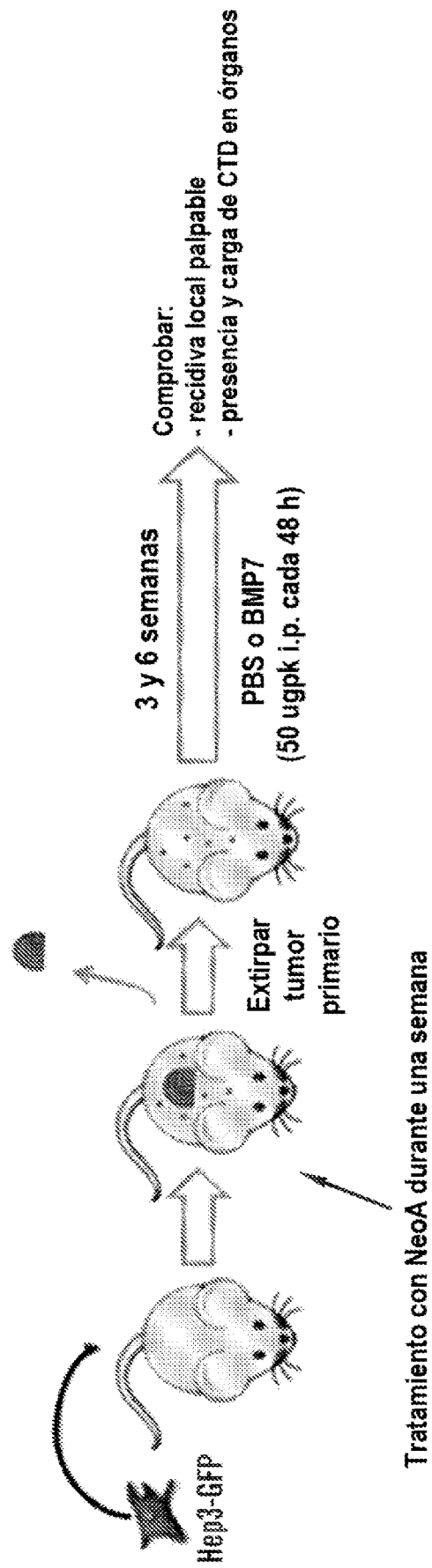


FIG. 15A

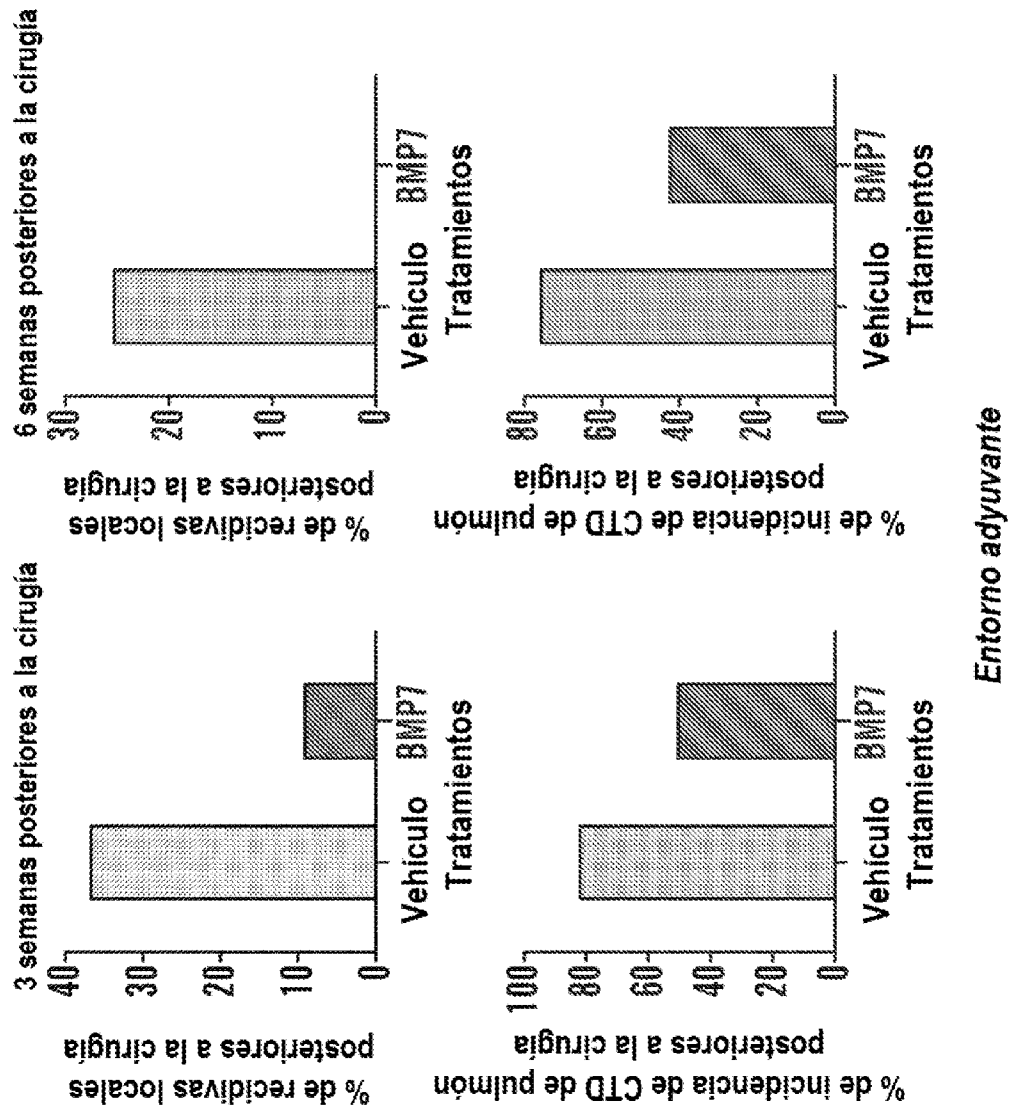


FIG. 15B

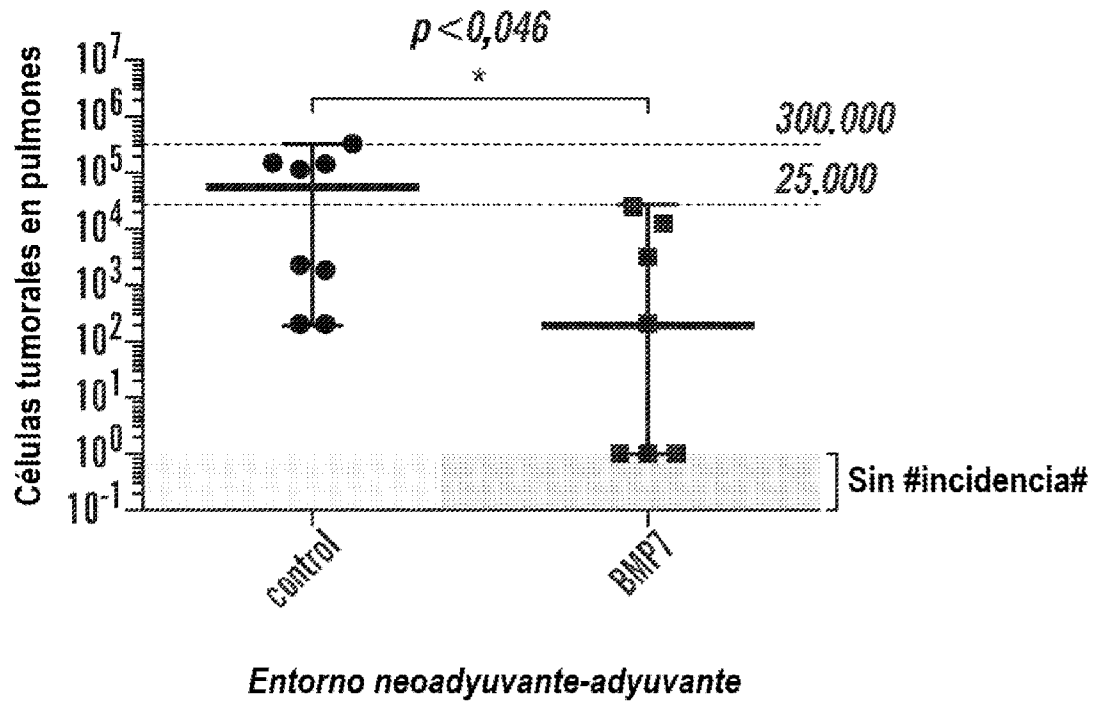


FIG. 15C