



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 991 090**

⑮ Int. Cl.:

C07D 213/79 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2018 PCT/US2018/024624**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2018 WO18183370**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2018 E 18774276 (2)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024 EP 3600301**

④ Título: **Inhibidores de KDM4**

⑩ Prioridad:

**30.03.2017 US 201762478785 P
01.06.2017 US 201762513875 P**

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2024

⑦ Titular/es:

**ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG (50.0%)
Zentrale Klinische Forschung, Breisacher Str. 66
79106 Freiburg, DE y
CELGENE QUANTICEL RESEARCH, INC. (50.0%)**

⑧ Inventor/es:

**SCHÜLE, ROLAND y
METZGER, ERIC**

⑨ Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 991 090 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

Inhibidores de KDM4

5 **Solicitud relacionada**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de la solicitud provisional estadounidense N.º 62/478.785, presentada el 30 de marzo de 2017, y de la solicitud provisional estadounidense N.º 62/513.875, presentada el 1 de junio de 2017.

10

Campo

Las realizaciones descritas en la presente descripción se refieren a compuestos para inhibir la actividad de la enzima lisina desmetilasa 4 (KDM4).

15

Antecedentes

Sigue existiendo la necesidad de compuestos para tratar cánceres.

20

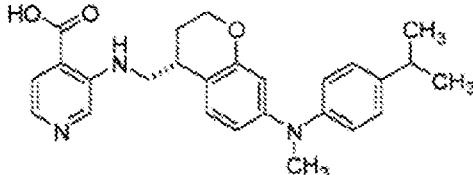
Los documentos WO 2015/200709 A1, WO 2014/100818 A1 y WO 2017/117154 A1 describen composiciones para tratar un cáncer y una enfermedad neoplásica. Se proporcionan en la misma compuestos derivados de piridina sustituidos y composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos. Los compuestos y las composiciones en cuestión son útiles para la inhibición de la desmetilasa de histonas.

25

Resumen

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. En particular, la invención se refiere a un compuesto, o a un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la fórmula: ácido 3-([(4R)-7-[metil[4-propan-2-il]fenil]amino]-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-4-il]metil]amino)piridin-4-carboxílico, representado por la estructura:

35



40

para su uso en la inhibición de un cáncer asociado con la actividad lisina desmetilasa 4 (KDM4), en donde el cáncer asociado a KDM4 se selecciona de cáncer de mama triple negativo, cáncer de colon, linfoma de Burkitt o leucemia mieloide aguda.

45

El cáncer asociado a KDM4 puede ser un cáncer de mama triple negativo.

50

El cáncer asociado a KDM4 puede ser un cáncer de colon.

El cáncer asociado a KDM4 puede ser un linfoma de Burkitt.

55

El cáncer asociado a KDM4 puede ser una leucemia mieloide aguda.

Descripción de los dibujos

60

La Figura 1A a la Figura 1H presentan datos relacionados con la caracterización de las células madre del cáncer de mama (BCSC) y las estirpes celulares y xenoinjertos derivados de las mismas. La Figura 1A muestra datos de crecimiento representativos de un ensayo de dilución limitante de xenoinjertos de células BCSC1 en ratones inmunodeprimidos. La Figura 1B muestra un análisis inmunohistoquímico del tumor de BCSC1 original del paciente y del tumor de xenoinjerto de BCSC1 que comprende tinción con hematoxilina y eosina (H y E), anti-CK8, anti-Ki67, anti-E-cadherina y anti-vimentina. Barra de escala: 100 µm. La Figura 1C muestra una tinción inmunohistoquímica con anti-ER, anti-PR y HER2 del tumor de BCSC1 original del paciente, del tumor de xenoinjerto de BCSC1 y de la muestra de control positivo. ER: receptor de estrógenos; PR: receptor de progesterona; HER2: factor 2 de crecimiento epidérmico humano; barra de escala: 100 µm. La Figura 1D proporciona un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado de datos de micromatrizes de ARN presentados como un dendrograma de agrupaciones. Las muestras son tumores de BCSC1, BCSC2, BCSC3 y BCSC4 originales del paciente; estirpes de BCSC1-4 derivadas; y tumores de xenoinjerto de BCSC1-4 derivados de las estirpes de BCSC 1-4. La Figura 1E son imágenes representativas que muestran el fenotipo celular de las células BCSC1 cultivadas en condiciones 3D (panel superior) y 2D (panel inferior).

5 Barra de escala, 100 μ m. La Figura 1F demuestra la capacidad de formación de esferas de las células BCSC1 en un ensayo de metilcelulosa (n = 3). Las comparaciones se realizaron usando ANOVA unidireccional. Los datos representan medias \pm e.e.m. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. La Figura 1G y la Figura 1H muestran patrones de expresión representativos de marcadores de células madre cancerosas en células BCSC1, según lo analizado por FACS (n = 3): La Figura 1G muestra una expresión de los marcadores CD24 y CD44; La Figura 1H muestra una expresión de los marcadores CD49f y EpCAM.

10 La Figura 2A a la Figura 2F demuestran que los inhibidores de KDM4 ("KDM4(i)") son potentes inhibidores de las células BCSC1. La Figura 2A muestra las inmunoelectrotransferencias anti-KDM4a, anti-KDM4B, anti-KDM4C, anti-KDM4D y anti-tubulina. Las muestras son lisados de HEK293T; HEK293T transfectadas con plásmidos de expresión que expresan KDM4A, KDM4B, KDM4C o KDM4D; células BCSC1; y células BCSC2. La Figura 2B ilustra la fórmula/estructura de KDM4(i), Compuesto I. La Figura 2C muestra un ensayo de proliferación celular representativo de células BCSC1 cultivadas en ausencia y presencia del Compuesto I (n = 3). •: vehículo; ▨: Compuesto I 10 nM; ▲: Compuesto I 50 nM; los datos representan medias \pm d.t. La Figura 2D es una curva de dosis-respuesta representativa para KDM4(i) en células BCSC1 (n = 3). Los datos representan medias \pm d.t. La Figura 2E muestra la capacidad de formación de esferas 3D de BCSC1 en un ensayo de crecimiento independiente del anclaje en ausencia y presencia de las concentraciones indicadas de un KDM4(i) (n = 3); 0: vehículo; 10: Compuesto I 10 nM; 50: Compuesto I 50 nM. La Figura 2F muestra una capacidad de formación de esferas primarias (1° esferas) y secundarias (2° esferas) de las células BCSC1 en Matrigel (n = 3); 10: Compuesto I 10 nM; 50: Compuesto I 50 nM; las comparaciones se realizaron usando ANOVA unidireccional; los datos representan medias \pm e.e.m. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

15 La Figura 3A a la Figura 3J muestran que un KDM4(i) puede acceder a BCSC a través de la regulación de EGFR. La Figura 3A es una gráfica circular que muestra el número de genes que están regulados de forma diferencial en las células BCSC1 tras un tratamiento con un KDM4(i): el transcriptoma de células BCSC1 con o sin exposición a KDM(i) (580 genes, p < 1e-5): 254 genes regulados por aumento y 326 genes regulados por disminución. La Figura 3B es un gráfico circular que muestra una distribución genómica de KDM4A en células BCSC1 según lo determinado por un análisis de ChIP-seq: picos de KDM4A (172.692 picos): 12,5 % de promotor; 40,5 % de intergénico; 41,0 % de intrón; 3,3 % de exón; y 2,7 % de UTR 3'. La Figura 3C es un diagrama de Venn que muestra la intersección y el número de genes donde KDM4A está presente en la región promotora con genes que están regulados diferencialmente en células BCSC1 tras un tratamiento con un KDM4(i). Una prueba hipergeométrica calculó la significación de las superposiciones (c; p<10-50). La Figura 3D ilustra análisis de las vías de KEGG (análisis de enriquecimiento de vías/vías comunes) (vías enriquecidas para el conjunto de 419 genes representados en la Figura 3C). La Figura 3E refleja un análisis del nivel de ARNm, más específicamente, un mapa de calor que representa los niveles de ARNm encontrados en células BCSC1 cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de un KDM4(i). Los 37 genes diana directos de KDM4A representan una firma génica común para todas las vías representadas en la Figura 3D. La Figura 3F es un gráfico de barras de los análisis de expresión en muestras obtenidas de células BCSC1 cultivadas en ausencia (barras negras) y presencia (barras grises) de KDM4(i) (n = 3). Los datos representan medias \pm d.t. *** p<0,0001; ** p<0,001 mediante la prueba de Student de dos colas. La Figura 3G y la Figura 3H son fotografías de inmunoelectrotransferencias anti-EGFR, anti-KDM4A y anti-tubulina que se generan a partir de lisados de células BCSC1 en ausencia (-) y presencia (+) de un KDM4(i) (Figura 3G); o células BCSC1 tratadas con control de ARNhC (Ctrl) o ARNhC anti-KDM4A (Figura 3H). La Figura 3I es un gráfico que muestra un metanálisis de secuenciación de la densidad de lectura basándose en ChIP-seq de H3K9me3 alrededor de los picos de KDM4A en células BCSC1 cultivadas en presencia (gris) o ausencia (negro) de un KDM4(i). Se realizó una prueba hipergeométrica para calcular la significación de las superposiciones; p<10-50. La Figura 3J muestra un análisis de pistas de ChIP-Seq de células BCSC1 en ausencia (oscuro) o presencia (claro) de un KDM4(i). Niveles normalizados de pistas de H3K9me3 en el promotor de EGFR.

20 Las Figura 4A a 4F muestran que KDM4(i) inhibe el crecimiento tumoral de xenoinjerto a partir de células BCSC1. Los ratones que portaban tumores de xenoinjerto de BCSC1 fueron tratados durante 21 días consecutivos con un vehículo o un KDM4(i). La Figura 4A es una fotografía de tumores de xenoinjerto de BCSC1 representativos aislados de animales individuales después de 21 días de tratamiento. La Figura 4B es un gráfico que representa un desarrollo de tumores, medido en mm^3 , a lo largo del tiempo (n = 11) (vehículo); (n = 12) (un tratamiento con KDM4(i))). Los datos representan medias \pm e.e.m. La Figura 4C muestra un peso del tumor al final del experimento (n = 11 (vehículo); n = 12 (tratado con KDM4(i))). Comparaciones mediante ANOVA unidireccional. Datos = medias \pm e.e.m. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. La Figura 4D muestra imágenes representativas de tumores; y la Figura 4E es un gráfico de barras del tamaño del volumen del tumor, en el que los datos se obtuvieron mediante formación de imágenes de ultrasonido al inicio del tratamiento (Día 0) y después de 21 días de tratamiento (Día 21) (n = 11 (vehículo), n = 12 (tratamiento con KDM4(i))). Las comparaciones se realizaron usando ANOVA unidireccional. Los datos representan medias \pm e.e.m. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. La Figura 4F es un gráfico de barras que muestra análisis de expresión de los xenoinjertos de BCSC1. Se obtuvieron muestras de tumores de xenoinjerto de BCSC1 de ratones tratados con vehículo (-) o un KDM4i (+KDM4(i))). Barras de error, d.t.; replicados biológicos (n = 3). *** p<0,0001; ** p<0,001 mediante la prueba de Student de dos colas.

25 La Figura 5A a la Figura 5G demuestran que las células BCSC2 y el xenoinjerto recapitulan el tumor original del paciente. La Figura 5A representa gráficamente curvas de crecimiento representativas de un ensayo de dilución limitante/formación de xenoinjertos de BCSC2 de células BCSC2 utilizando xenoinjertos de BCSC2 en un modelo de

ratón inmunodeprimido. La Figura 5B muestra fotografías de una tinción inmunohistoquímica con hematoxilina y eosina (H y E), anti-CK8, anti-Ki67, anti-E-cadherina y anti-vimentina. Las muestras son el tumor de BCSC2 original del paciente y el tumor de xenoinjerto de BCSC2. La Figura 5C muestra fotografías de tinción inmunohistoquímica con anti-ER, anti-PR y HER2 del tumor de BCSC2 original del paciente y del tumor de xenoinjerto de BCSC2. ER: receptor de estrógenos; PR: receptor de progesterona; HER2: factor 2 de crecimiento epidérmico humano; barra de escala, 100 μ m. La Figura 5D muestra fotografías representativas de células BCSC2 cultivadas en condiciones 3D y 2D. La Figura 5E es un gráfico de barras que muestra la capacidad de formación de esferas de las células BCSC2 en un ensayo de metilcelulosa (n = 3). Comparaciones mediante ANOVA unidireccional; los datos representan medias \pm e.e.m.; *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. La Figura 5F y la Figura 5G son patrones de expresión representativos de los marcadores de CSC CD24 y CD44 (Figura 5F); y CD49f y EpCAM (Figura 5G) en células BCSC2 analizadas mediante FACS (n = 3).

La Figura 6A a la Figura 6F muestran que un KDM4(i) es un potente inhibidor de las células BCSC2. La Figura 6A es un gráfico que refleja un ensayo de proliferación celular en el que se cultivaron células BCSC2 en ausencia (•) o presencia de 10 nm (■) o 50 nm (▲) de KDM4(i). La Figura 6B es un gráfico que representa una curva de dosis-respuesta representativa para un KDM4(i) en células BCSC2 (n = 3). Los datos representan medias \pm e.e.m. La Figura 6C es un gráfico de barras de la formación de esferas de BCSC2 en un ensayo de crecimiento independiente del anclaje, en ausencia (barra izquierda) o presencia de 10 nM (barra central) o 50 nM (barra derecha) de un KDM4(i) (n = 3). La Figura 6D es un gráfico de barras de la capacidad de formación de esferas primarias y secundarias de las células BCSC2 en Matrigel. Durante la primera semana, las células se cultivaron en ausencia (-) y presencia (50 nM) de un KDM4(i). Comparaciones mediante ANOVA unidireccional. Los datos representan medias \pm e.e.m. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. La Figura 6E y la Figura 6F son gráficos representativos de ensayos de apoptosis de células BCSC1 (Figura 6E) y células BCSC2 (Figura 6F) en ausencia (Vehículo) o presencia de un KDM4(i), según lo analizado mediante FACS (n = 3). Los datos representan medias \pm e.e.m.

La Figura 7A a la Figura 7K demuestran que una realización de un KDM4(i) accede a BCSC2 a través de la regulación de EGFR. La Figura 7A es un diagrama de Venn de las ubicaciones de las células BCSC1 y KDM4A, que muestra el número de ubicaciones en las células BCSC1 de control (Ctrl (172.639)) y en las células BCSC1 infectadas por un adenovirus que expresa un ARNhc contra KDM4A (KDM4A KD (3.215)) que muestra una superposición de 1110 ubicaciones. La Figura 7B y la Figura 7C muestran datos de ensayos de proliferación de células BCSC, más específicamente, la proliferación representativa de células BCSC1 (Figura 7B) y BCSC2 (Figura 7C) en ausencia (Vehículo) y presencia de 10 μ M de Erlotinib (n = 3). Los datos representan medias \pm e.e.m. La Figura 7D y la Figura 7E son gráficos de dosis-respuesta representativos de la exposición a erlotinib en células BCSC1 (Figura 7D) y células BCSC2 (Figura 7E) (n = 3). Los datos representan medias \pm e.e.m. La Figura 7F y la Figura 7G muestran la capacidad de formación de esferas 3D de BCSC1 (Figura 7F) y BCSC2 (Figura 7G) en un ensayo de crecimiento independiente del anclaje en ausencia (barra izquierda) y en presencia de 1 μ M (barra central) o 10 μ M (barra derecha) de Erlotinib. Comparaciones mediante ANOVA unidireccional; medias \pm e.e.m. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. La Figura 7H y la Figura 7I muestran inmunoelectrotransferencias anti-EGFR, anti-KDM4A y anti-tubulina. Las muestras son lisados de células BCSC2 cultivadas en ausencia y presencia de un KDM4(i) (Figura 7H); o tratadas con un control de ARNhc (Ctrl) o ARNhc contra KDM4A (Figura 7I). La Figura 7J son dos gráficos circulares que muestran una distribución genómica de H3K9me3 en las células BCSC1 en ausencia (picos de H3K9me3: 141.722 picos) o presencia de KDM4(i) (picos de H3K9me3: 144.266 picos) según lo determinado por un análisis de ChIP-seq: Vehículo: 6,2 % de promotor; 47,3 % de intergénico; 41,2 % de intrón; 2,8 % de exón; 2,4 % de UTR 3'; +KDM4(i): 6,2 % de promotor; 47,7 % de intergénico; 40,7 % de intrón; 2,9 % de exón; 2,4 % de UTR 3'. La Figura 7K es un diagrama de Venn que muestra el número y la intersección de las ubicaciones de KDM4A y H3K9me3 en células BCSC1 cultivadas en ausencia o presencia de un KDM4(i). Se realizó una prueba hipergeométrica para calcular la significación de las superposiciones (i; p < 10⁻⁵⁰).

La Figura 8A a la Figura 8G demuestran que un KDM4(i) inhibe el crecimiento tumoral de xenoinjerto en ratones portadores de tumores de xenoinjerto de BCSC2 tratados durante 21 días consecutivos con un vehículo o un KDM4(i). La Figura 8A son fotografías de tumores de xenoinjerto de BCSC2 representativos aislados de animales individuales después de 21 días de tratamiento. La Figura 8B es un gráfico que muestra un desarrollo de tumores (medido en mm³) (n = 6). Los datos representan medias \pm e.e.m. La Figura 8C es un gráfico de barras de los pesos de los tumores al final del experimento de 21 días (n = 6). Comparaciones mediante ANOVA unidireccional; los datos representan medias \pm e.e.m. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. La Figura 8D muestra imágenes representativas de tumores; y la Figura 8E es un gráfico de barras de la cuantificación del volumen de todos los tumores que se obtiene mediante formación de imágenes de ultrasonido al inicio del tratamiento (Día 0) y después de 21 días de tratamiento (Día 21) (n = 6). Comparaciones mediante ANOVA unidireccional; los datos representan medias \pm e.e.m. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. La Figura 8F y la Figura 8G muestran un peso corporal de ratones portadores de tumores de xenoinjerto de BCSC1 (Figura 8F) o tumores de xenoinjerto de BCSC2 (Figura 8G) durante un período de tratamiento de 21 días consecutivos con un vehículo o un KDM4(i). Los datos representan medias \pm e.e.m.

La Figura 9 presenta una serie de ilustraciones relacionadas con la estructura y función de KGM4. (A) es una estructura esquemática de cuatro proteínas KDM4. El dominio JmjN es necesario para la actividad del centro catalítico JmjC. (B) muestra los modos de función de KDM4 como desmetilasas o independientes de la actividad enzimática. (C) muestra SDH, FH e IDH en el ciclo de Krebs. El succinato se acumula tras la mutación de SDH o FH, mientras que las

mutaciones neomórficas de IDH conducen a la producción de 2-hidroxiglutarato. Esta figura se ha reproducido de Berry y Janknecht, KDM4/JMJD2 Histone Demethylases: Epigenetic Regulators in Cancer Cells, 73(10) Cancer Res. 2936 (2013).

5 **Descripción detallada**

Como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones, las formas singulares incluyen la referencia en plural y viceversa a menos que el contexto, claramente, lo indique de cualquier otra manera. A lo largo de esta especificación, 10 a menos que se indique de cualquier otra manera, “comprender”, “comprende” y “que comprende” se usan de forma inclusiva y no exclusiva, de modo que un número entero o grupo de números enteros declarados puede incluir uno o más números enteros o grupos de números enteros no declarados. El término “o” es inclusivo a menos que se modifique, por ejemplo, por “o bien”. Cuando los intervalos se usan en la presente descripción para las propiedades 15 físicas, tales como el peso molecular, o las propiedades químicas, tales como las fórmulas químicas, todas las combinaciones y las subcombinaciones de los intervalos y las realizaciones específicas en ellas se destinan a estar incluidas. Aparte de los ejemplos operativos, o donde se indique de cualquier otra manera, todos los números que 20 expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción usados en la presente descripción deben entenderse modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”. El término “aproximadamente” cuando se refiere a un número o un intervalo numérico significa que el número o el intervalo numérico al que se hace referencia es una aproximación dentro de la variabilidad experimental (o dentro del error experimental estadístico) y, por lo tanto, el número o el intervalo numérico puede variar entre el 1 % y el 15 % del número o el intervalo numérico indicado, como se reconocerá fácilmente por el contexto.

A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con las formulaciones 25 descritas en la presente memoria tendrán los significados que entienden habitualmente los expertos en la materia. La terminología usada en la presente descripción tiene solo el propósito de describir realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones.

Las realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan una terapia particularmente indicada cuando el 30 estado patológico del sujeto (por ejemplo, cáncer o enfermedad neoplásica) está asociado con la epigenética o el estado epigenético del sujeto.

A modo de antecedente, la epigenética es el estudio de los cambios heredables en la expresión génica provocados 35 por mecanismos distintos de la secuencia de ADN subyacente. Los mecanismos moleculares que juegan un papel en la regulación epigenética incluyen la metilación del ADN y las modificaciones de la cromatina/histona. Los genomas de los organismos eucariotas están altamente organizados dentro del núcleo de la célula. Se requiere una compactación enorme para empaquetar los 3 mil millones de nucleótidos del genoma humano en el núcleo de una 40 célula. La cromatina es el complejo de ADN y proteína que forma los cromosomas. Las histonas son el principal componente proteico de la cromatina, que actúan como carretes alrededor de los cuales se enrolla el ADN. Hay seis clases de histonas (H1, H2A, H2B, H3, H4 y H5) organizadas en dos grupos: histonas centrales (H2A, H2B, H3 y H4) e histonas enlazadoras (H1 y H5). La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, que consiste en aproximadamente 147 pares de bases de ADN envueltos alrededor del octámero de histonas centrales, que consiste en dos copias de cada una de las histonas centrales H2A, H2B, H3 y H4. Los cambios en la estructura de la cromatina 45 se ven afectados por las modificaciones covalentes de las proteínas histonas y por las proteínas de unión no histonas. Por ejemplo, la metilación, la acetilación del ADN y otras modificaciones postraduccionales de las proteínas histonas del nucleosoma alteran la organización de la cromatina y la expresión génica sin alterar la secuencia de ADN subyacente. Por tanto, las alteraciones en el entorno epigenético celular, y no solo las mutaciones genéticas primarias, 50 desempeñan un papel importante en la formación, la progresión y la resistencia del tumor al tratamiento, puesto que la modificación epigenética puede influir en si, cuándo o dónde se expresan genes específicos. Chaidos y col., 6 Ther. Adv. Hematol. 128 (2015). La modificación epigenética es un proceso dinámico y reversible que es escrito, borrado y leído por varias familias de enzimas. Se conocen varias clases de enzimas que modifican las histonas en varios sitios. Arrowsmith y col., 11 Nature Rev. Drug Discov. 384 (2012). Véase también la patente estadounidense N.º 9.255.097.

55 Las histonas “desmetilasas” son enzimas que eliminan al menos un grupo metilo de un polipéptido, y las desmetilasas particulares pueden desmetilar un sustrato monometilado, dimetilado o trimetilado. Las histonas desmetilasas pueden actuar sobre un sustrato que incluye histonas centrales metiladas, mononucleosomas, dinucleosomas, oligonucleosomas, péptidos o cromatina (p. ej., en un ensayo basado en células). Ejemplos de desmetilasas específicas de lisina incluyen desmetilasa 1 específica de lisina (LSD1 o KDM1), que desmetila H3K4 o H3K9 monometilada y dimetilada, mediante el uso de la flavina como cofactor; y una familia de desmetilasas caracterizadas 60 por un dominio Jumonji C (JmjC) de ~150 aminoácidos de longitud (p. ej., la histona desmetilasa 1 que contiene el dominio jumonji [JHDM1/KDM2A]). Véase, p. ej., la patente estadounidense N.º 9.255.097; WO 2015/200709.

65 Más específicamente, la LSD1 humana y su parólogo, la LSD2, desmetilan tanto la lisina 4 en histona H3 (H3K4) como la H3K9 monometilada y dimetilada mediante una reacción de oxidación de aminas dependiente de FAD. A diferencia del mecanismo dependiente de FAD de LSD1/2, las proteínas que contienen el dominio Jumonji C (JMJD) actúan a través de un mecanismo de reacción de dioxygenasa que requiere Fe^{2+} , O_2 , y 2-oxoglutarato para desmetilar histonas.

La etapa catalítica de JMJD es la hidroxilación de un grupo metilo de la lisina, que lo convierte en un resto hidroximetilo que abandona espontáneamente el centro nitrogenado de la lisina y libera formaldehído. Esta reacción permite a las proteínas JMJD, en principio, desmetilar los residuos de lisina trimetilados, dimetilados y monometilados, mientras que la LSD1/2 no puede atacar los residuos de lisina trimetilados debido al requisito de un par de electrones libres en el nitrógeno metilado. La mayoría de las proteínas JMJD desmetilan H3K4, H3K9, H3K27, H3K36 o H4K20, pero la actividad enzimática de varias proteínas JMJD sigue siendo desconocida, algunas desmetilasas JMJD pueden tener actividad metilarginina desmetilasa y algunas otras proteínas JMJD pueden no tener actividad catalítica alguna. Véase Berry y Janknecht, KDM4/JMJD2 Histone Demethylases: Epigenetic Regulators in Cancer Cells, 73(10) Cancer Res. 2936 (2013); véase también la Figura 9. Además de JHDM1/KDM2A que se ha mencionado anteriormente, las proteínas JMJD incluyen una treintena de miembros humanos agrupados filogenéticamente en siete subfamilias: JMJD2, JHDM1, JHDM2, JHDM3, JARID, PHF2/PHF8, UTX/UTY y sólo el dominio JmjC. Véase, p. ej., la patente estadounidense N.º 9.447.046.

Una de las mayores subfamilias de JMJD, la familia de proteínas JMJD2A-E, se denomina preferiblemente KDM4 por K por (lisina) desmetilasa 4. La subfamilia KDM4 incluye KDM4A, B, C y D. KDM4 puede reconocer como sustratos H3K9 y H3K36 dimetilada y trimetilada, así como H1.4K26 trimetilada. Berry y Janknecht, 2013. Por ejemplo, la expresión ectópica de los miembros de la familia KDM4 disminuyó drásticamente los niveles de H3K9 trimetilada y dimetilada, y aumentó los niveles de H3K9 monometilada, que a continuación deslocaliza la proteína heterocromatina 1 y redujo los niveles generales de heterocromatina *in vivo*. Es importante destacar que las desmetilasas KDM4 catalizan la desmetilación tanto de la marca de H3K9me3 como de la marca de H3K36me3 represiva, esta última vinculada al alargamiento transcripcional. Frank y col., Therapeutic promise of cancer stem cell concept, 120 J. Clin. Invest. 41 (2010).

El cáncer de mama es la principal causa mundial de muerte por cáncer entre las mujeres. Ferlay y col., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence & Mortality Worldwide: IARC Cancer Base N.º 11 (2013). La progresión del cáncer se asocia con alteraciones de los reguladores epigenéticos, tales como histona-lisina desmetilasa 4 (KDM4). Dave y Chang, Treatment resistance in stem cells & breast cancer, 14 J. Mamm. Gland Biol. Neoplasia 79 (2009); Frank y col., Therapeutic promise of cancer stem cell concept, 120 J. Clin. Invest. 41 (2010); Pattabiraman y Weinberg, Targeting Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Case for Differentiation-Based Therapy, Cold Spring Harbor Sympos. Quantitat. Biol. (2017); Sharma y col., Induction of CXCR2 ligands, stem cell-like phenotype, & metastasis in chemotherapy-resistant breast cancer cells, 372 Cancer Lett. 192 (2016).

Durante la terapia contra el cáncer de mama, los tratamientos clásicos no abordan las poblaciones de células madre cancerosas resistentes, y la acción dirigida a la proteína o función de KDM se perfila como una posible vía de tratamiento. Zhang y col., Cellular orig. & evol. breast cancer, Cold Spring Harbor Perspect. Med. (2017); Chu y col., KDM4B as target for prostate cancer: structural analysis & selective inhibition by novel inhibitor, 57 J. Med. Chem. 5975 (2014); Labbe y col., Histone lysine demethylase (KDM) subfamily 4: structures, functions & therapeutic potential, 6 Am. J. Transl. Res. 1 (2013); Qiu y col., KDM4B & KDM4A promote endometrial cancer progression by regulating androgen receptor, c-myc, & p27kip1, 6 Oncotarget 31702 (2015); Soini y col., KDM4A, KDM4B & KDM4C in non-small cell lung cancer, 8 Int'l J. Clin. Exper. Pathol. 12922 (2015).

Las presentes realizaciones proporcionan un inhibidor de KDM4 con características preclínicas únicas. Este KDM4(i) es un inhibidor pan-KDM4 muy potente que bloquea específicamente la actividad desmetilasa de KDM4A, B, C y D, pero no la de los demás miembros de la familia KDM. Las propiedades antitumorales de KDM4(i) se validaron en condiciones que recapitulaban los tumores de los pacientes.

Se proporciona un método para aislar y cultivar células madre de cáncer de mama triple negativo (BCSC) a partir de tumores de pacientes individuales después de la quimioterapia neoadyuvante. Los xenoinjertos ortotópicos de dilución limitante de estas BCSC regeneraron fielmente la histología del tumor original del paciente y la expresión génica. El KDM4(i) bloquea la proliferación, la formación de esferas y el crecimiento tumoral de xenoinjerto de BCSC. Es importante destacar que el KDM4(i) anula la expresión del EGFR, un impulsor de las células tumorales de mama triple negativo y resistentes a la terapia mediante la inhibición de la actividad desmetilasa KDM4A. Hsu & Hung, Role of HER2, EGFR, & other receptor tyrosine kinases in breast cancer, 35 Cancer Metast. Rev. 575 (2016). Las presentes realizaciones proporcionan un sistema de cultivo de BCSC único como base para la identificación de compuestos terapéuticos y demuestran que la inhibición de KDM4 es una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo.

La desregulación de las desmetilasas KDM4 se ha documentado en una variedad de cánceres, incluido el cáncer de mama. Berry y Janknecht, 2013. Se ha demostrado que KDM4 controla la proliferación de células tumorales, particularmente en los cánceres de mama agresivos. Ye y col., Genetic alterations of KDM4 subfamily & therapeutic effect of novel demethylase inhibitor in breast cancer, 5 Am. J. Cancer. Res. 1519 (2015). La resistencia a la terapia y la diseminación metastásica son los principales problemas a los que se enfrenta el tratamiento contra el cáncer de mama. Se ha sugerido que las células madre de cáncer de mama son responsables tanto de la resistencia a la terapia como de la diseminación metastásica. Chu y col., 2014; Ansieau, EMT in breast cancer stem cell generation, 338 Cancer Lett. 63 (2013). Sin embargo, estas poblaciones de células madre cancerosas resistentes (CSC) solamente se han caracterizado de manera deficiente y aún no se han identificado las terapias dirigidas. Debido a que las

desmetilasas KDM4 pueden proporcionar dianas terapéuticas eficaces para el tratamiento del cáncer, se desarrolló una prueba de detección sistemática para identificar nuevos inhibidores de KDM4. Con el fin de validar los inhibidores en condiciones que imitan a las poblaciones de células madre cancerosas, se desarrolló un nuevo método de cultivo 3D como se describe en la presente descripción, utilizando condiciones definidas sin suero y un entorno con bajo contenido de oxígeno para enriquecer las BCSC de los tumores de pacientes individuales después de la quimioterapia neoadyuvante.

Como se muestra en la Tabla 1, a continuación, se establecieron cultivos de cuatro estirpes de BCSC diferentes (BCSC1, 2, 3 y 4). Todas las estirpes se originaron a partir de tumores mamarios primarios que eran triple negativos: receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) negativos; todos los tumores de xenoinjerto establecidos a partir de estas estirpes fueron triple negativos.

Tabla 1. Tumor de BCSC1-4 original del paciente, estirpes de células BCSC1-4 y xenoinjertos de BCSC1-4

Tumor de paciente			Tumor de xenoinjerto	
ID	Diagnóstico primario	Fármacos quimioterapéuticos administrados por vía neoadyuvante	Clasificación	Formación tumoral
BCSC1	IC	FEC, FAC, TAC, TC, Cisplatino	Triple negativo	36/38
BCSC2	IDC	Taxol, Myocet	Triple negativo	30/43
BCSC3	IDC	CE, Taxotere	Triple negativo	7/7
BCSC4	MC	AC, Taxol, GemCa	Triple negativo	12/2

BCSC1-4: células madre de cáncer de mama 1-4; IC: carcinoma invasivo; IDC: carcinoma ductal invasivo; MC: carcinoma metaplásico; FEC: SFU/epirrubicina/ciclofosfamida; FAC: 5FU/doxorubicina/ciclofosfamida; TAC: docetaxel/doxorubicina/ciclofosfamida; TC: docetaxel/ciclofosfamida; EC: epirrubicina/ciclofosfamida; AC: doxorubicina/ciclofosfamida; GemCa: carboplatino/gemcitabina.

Se determinó que la frecuencia estimada de células madre cancerosas en los cultivos de BCSC (mediante trasplante por dilución limitante del número de células) variaba de 0,26 a 179 en 1×10^5 células, como se refleja en la Tabla 2:

Tabla 2. Dilución limitante/formación de tumores de xenoinjerto

Número de células	1×10^5	1×10^4	1×10^3	Células madre/ 1×10^5
BCSC1	36/38	8/8	3/4	5,1
BCSC2	30/42	3/4	2/2	1,5
BCSC3	6/6	6/6	6/6	179
BCSC4	5/6	3/6	0/6	0,26

Los xenoinjertos ortotópicos de dilución limitada de estas BCSC triple negativo en ratones NOD/SCID inmunodeprimidos produjeron tumores triple negativos que se asemejaban mucho con el tumor primario del paciente tanto morfológica como fenotípicamente. Tablas 1 y 2; Figura 1C; Figura 5A. Los análisis inmunohistoquímicos de los marcadores epiteliales mamarios citoqueratina 8, E-cadherina y vimentina, así como los análisis del marcador de proliferación Ki67 de los tumores de xenoinjerto de BCSC1 y BCSC2, mostraron que los tumores de xenoinjerto comparten un patrón similar al de los tumores de los pacientes parentales. Figura 1B; Figura 5B. De hecho, al coincidir con el tumor parental, los xenoinjertos de BCSC fueron negativos para la expresión de la expresión de las proteínas ER, PR y HER2. Tabla 1, Figura 1C; Figura 5C.

Adicionalmente, el análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado de los datos de micromatrices de ARN mostró que los xenoinjertos tumorales comparten un perfil cercano con los tumores parentales, lo que indica una preservación del subtipo de tumor molecular respectivo. Figura 1D. Las estirpes de BCSC se agruparon por separado del tumor hospedador y del xenoinjerto, especificando las propiedades únicas de estas células. No obstante, se agruparon en el subtipo de tumor hospedador, lo que representa una estrecha correlación entre las tres entidades. Figura 1D.

Las BCSC también se cultivaron en un entorno 3D y 2D, creciendo como esferoides y principalmente como agrupaciones epiteliales, respectivamente. Figura 1E; Figura 5D. Cuando se les expuso en un ensayo de crecimiento independiente del anclaje, las células BCSC1 y BCSC2 demostraron una capacidad de formación de esferas del 11 % y del 17 %, respectivamente. Figura 1F; Figura 5E. Las BCSC no clasificadas, aisladas y cultivadas como se ha descrito anteriormente, expresaron en diversos grados los marcadores de CSC bien conocidos, tales como CD24/CD44 (Figura 1G); Figura 5I) y CD49f/EpCAM (Figura 1H; Figura 5J). En conjunto, los datos muestran que las

BCSC de los tumores de mama triple negativo pueden aislarse y cultivarse directamente del tejido del paciente para proporcionar una plataforma celular *in vitro* que represente esta enfermedad. Esto permite la identificación y validación de nuevas estrategias dirigidas al cáncer *in vitro* e *in vivo*.

5 Los niveles de expresión en las células BCSC de los diversos miembros de la familia KDM4 se evaluaron mediante análisis de inmunoelectrotransferencia. Metzger y col., LSD1 desmetila las marcas de histonas represivas para promover la transcripción dependiente del receptor de andrógenos, 437 *Nature* 436 (2005). Como se muestra en la Figura 2A, KDM4A se expresó a niveles altos tanto en las células BCSC1 como en BCSC2. Estas células también presentaron niveles de expresión heterogéneos de KDM4B, KDM4C y KDM4D. Estas observaciones indican que KDM4 son dianas terapéuticas para el tratamiento de poblaciones de BCSC. En consecuencia, se realizó una prueba de identificación sistemática para caracterizar KDM4(i) a fin de explorar los compuestos adecuados para tratar los cánceres, en particular, los cánceres tales como los tumores de BSC clonales resistentes a la terapia. Esta prueba de identificación sistemática confirmó la eficacia de un KDM4(i) particular mostrado en la Figura 2B (Compuesto I). Es importante destacar que este KDM4(i) bloqueó específicamente las actividades desmetilasa de KDM4A, 4B, 4C y 4D ($IC_{50} < 105$ nM) pero no afectó a la actividad desmetilasa de las otras KDM. Cabe destacar que KDM4(i) mostró un efecto débil sobre la actividad desmetilasa de KDM5B. La Tabla 3 muestra la concentración inhibitoria semi-máxima (IC_{50}) de un Compuesto I contra las desmetilasas KDM:

Tabla 3. IC_{50} de KDM4(i) por miembro de KDM4		
	Miembro de la familia KDM4	IC_{50} de Compuesto I (μ M)
20	KDM4A	0,104
25	KDM4B	0,056
30	KDM4C	0,035
35	KDM4D	0,104
40	KDM2A	>10
45	KDM2B	>10
50	KDM5B	0,750
55	KDM6A	>10
60	KDM6B	>10

Por otra parte, KDM4 (i) inhibió fuertemente la proliferación de varios tipos de estirpes celulares cancerosas, incluyendo las células de cáncer de mama triple negativo: MDA-MB-231. La Tabla 4 muestra la concentración eficaz semi-máxima (EC_{50}) del Compuesto I en varias estirpes celulares cancerosas, como se muestra en un ensayo de MTS celular de 7 días:

Tabla 4. EC_{50} de KDM4(i) por estirpe celular cancerosa		
	Estirpe celular	EC_{50} de Compuesto I (nM)
45	Jurkat	1,1
50	Kyse-150	5,1
55	MDA-MB-231	5,9
60	PC-3	8,2
65	HCT-116	11
	Raji	12
	DU-145	13
	HCC-70	27
	Kasumi	34
	HL-60	43
	NCI-H1792	65
	NCI-H460	68

5 Tabla 4. EC₅₀ de KDM4(i) por estirpe celular cancerosa

Estirpe celular	EC ₅₀ de Compuesto I (nM)
U-87	>10.000
IR-90	>10.000
ZR-75-1	>10.000

10 Es más, los estudios farmacocinéticos indicaron que KDM4(i), tal como el Compuesto I, tiene propiedades que demuestran su idoneidad para su uso en la clínica. Ejemplos de datos farmacocinéticos se muestran en la Tabla 5:

15 Tabla 5. Parámetros PK de KDM4(i)

Dosis iv/po (mg/kg)	5/10
po 1/2 (h)	2,57
AUC po (µg h/ml)	10,4
Vz (ml/kg)	666
F %	30,4

20 AUC: Área bajo la curva (curva de concentración plasmática-tiempo); iv: intravenoso; po: por vía oral; Vz: volumen aparente de distribución durante la fase terminal; F %: biodisponibilidad (disponibilidad sistémica de la dosis administrada)

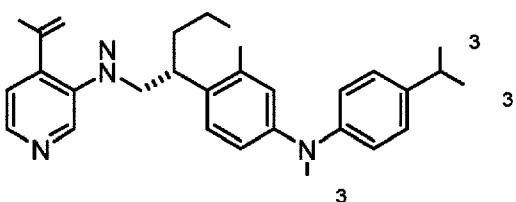
25 En cuanto a la eficacia de KDM4(i) sobre la proliferación de BCSC, concentraciones tan bajas como KDM4(i) (Compuesto I) 10 nM inhibieron la proliferación de BCSC1 y BCSC2, y KDM4(i) 50 nM inhibieron fuertemente la supervivencia de BCSC1 y BCSC2. Figura 2C, Figura 2D; Figura 6A, Figura 6B. Este efecto inhibidor fue incluso más evidente en un ensayo de formación de esferas independiente del anclaje en el que KDM4(i) redujo drásticamente la capacidad de formación de esferas de las células BCSC1 y BCSC2. Figura 2E; Figura 6C. Es más, cuando se sembraron durante el tratamiento con KDM4(i) en la matriz MATRIGEL®, la formación de esferas de las células BCSC1 disminuyó significativamente en las esferas de primera generación. Cuando se volvió a sembrar después de una semana durante el tratamiento con KDM4(i), se suprimió la capacidad de formación de esferas secundarias, incluso sin la presencia del inhibidor. Figura 2F; Figura 6D. En conjunto, KDM4(i), Compuesto I, presentó características preclínicas únicas que respaldan su uso para el tratamiento de tumores con factores dependientes de BCSC.

30 El mecanismo molecular de la inhibición de KDM4(i) se exploró más a fondo mediante el uso del análisis del transcriptoma que identificó los genes regulados diferencialmente tras el tratamiento con KDM4(i). Más específicamente, las células BCSC1 cultivadas en presencia y ausencia de KDM4(i) se analizaron mediante ARN-seq, lo que indicó que tras el tratamiento con un KDM4(i), se regularon diferencialmente un total de 580 genes. Entre ellos, 254 genes estaban regulados por aumento y 326 genes por disminución. Figura 3A. ChIP-seq analizó si estos genes son dianas directas de KDM4A en células BCSC1 con un anticuerpo anti-KDM4A. Los análisis, mostrados en la Figura 3B, identificaron 172.692 picos de KDM4A de alta confianza. Solamente se observaron 3215 (1,8 %) localizaciones de KDM4A en células BCSC2 tratadas con ARNip contra KDM4A, confirmando así la especificidad del anticuerpo contra KDM4A. Figura 7A. Este hallazgo impulsó la caracterización de la intersección del cistroma de KDM4A con el transcriptoma de KDM4(i). Entre los 580 genes regulados diferencialmente tras el tratamiento con KDM4(i), KDM4A estaba presente en el promotor de 419 genes (72 %). Figura 3C. El análisis de las vías de estos genes reveló una “vía de señalización del receptor de EGF” entre las vías con mayor puntuación. Figura 3D. Es importante destacar que las vías con mayor puntuación comparten una firma génica común de 37 genes diana directos de KDM4A que se regulan diferencialmente tras el tratamiento con KDM4(i). Figura 3E. Además, el análisis de qRT-PCR verificó que el tratamiento con los genes de KDM4(i) reducía los niveles de expresión de genes, tales como VCAN, PRR5, ATF4, EGR1, FST, RUNX1 y, lo que es más importante, EGFR. Figura 3F.

35 40 45 50 55 60 65 EGFR es una diana terapéutica emergente asociada con un mal resultado clínico del cáncer de mama triple negativo. Hsu y Hung, 2016. Para desentrañar la importancia de la señalización del EGFR en el crecimiento de las células BCSC, las células BCSC1 y BCSC2 se trataron con un inhibidor específico del EGFR: erlotinib. El tratamiento con erlotinib bloqueó la proliferación de las células BCSC1 y BCSC2. Figura 7B-Figura7E. Es más, la capacidad de formación de colonias 3D de las células BCSC1 y BCSC2 se redujo drásticamente tras el tratamiento con erlotinib. Figura 7F, Figura 7G. En conjunto, estos datos demostraron que EGFR controla el crecimiento de las células BCSC. Es importante destacar que, como lo demuestra el análisis de inmunoelectrotransferencia, los niveles proteicos de EGFR se redujeron drásticamente en las células BCSC1 y BCSC2 tras el tratamiento con KDM4(i). Figura 3G; Figura 7I. Dado que el EGFR es una diana directa de KDM4A, se determinó si la atenuación génica de KDM4A afecta a los niveles de proteína del EGFR. Como se muestra, la atenuación génica de KDM4A mediada por adenovirus conduce

a niveles reducidos de EGFR tanto en las células BCSC1 como en BCSC2. Figura 3H; Figura 7I. Estos datos indican que en las BCSC, la inhibición de KDM4A por KDM4(i) bloquea la expresión de EGFR.

- 5 Debido a que KDM4A es una desmetilasa de la marca represiva de H3K9me3, tras la inactivación de KDM4A por KDM4(i), podría observarse un aumento de H3K9me3. Un ensayo de ChIP-seq en el que se utilizó un anticuerpo anti-H3K9me3 identificó 141.722 picos de H3K9me3 de alta confianza en células no tratadas y 144.266 picos en células tratadas con KDM4(i). Figura 7J. La superposición de ubicaciones de KDM4A con ubicaciones de H3K9me3 en presencia y ausencia de KDM4(i) reveló que 81.717 ubicaciones estaban ocupadas conjuntamente. Figura 7K. Se observó un aumento general de las lecturas de H3K9me3 con respecto a los picos de KDM4A. Figura 3I. De manera similar, en el promotor de EGFR, se observó un aumento de la marca represiva de H3K9me3 con respecto al pico de KDM4A tras la inactivación por parte de KDM4(i). Figura 3J. Estos datos se correlacionan con la represión transcripcional que se observa tras el tratamiento con KDM4(i). Figura 3F. En resumen, el tratamiento de las BCSC con KDM4(i) se dirige al EGFR, uno de los principales factores de las células tumorales de mama triple negativo resistentes a la terapia, al inhibir la actividad desmetilasa KDM4A.
- 10 15 De manera adicional, se estudió el impacto de KDM4(i) en el crecimiento de los xenoinjertos tumorales de BCSC1 y BCSC2 en ratones NOD/SCID inmunodeprimidos que portaban tumores de xenoinjerto con desdiferenciación tumoral focal tras 21 días de tratamiento con KDM4(i). El tratamiento con KDM4(i) afectó enormemente al crecimiento tumoral y al peso final del tumor de los xenoinjertos de BCSC1 y BCSC2. Figura 4A-Figura 4E; Figura 8A-Figura 8E. Es importante destacar que el tratamiento con KDM4(i) nunca afectó al peso total de los ratones. Figura 8F, Figura 8G. Es más, el tratamiento de KDM4(i) afectó a la expresión de los genes diana de KDM4A de una manera similar a la observada en el cultivo celular. Figura 3F. Como se muestra en la Figura 4F, la expresión de PRR5, ATF4, EGR1, FST, RUNX1 y EGFR se vio afectada en los tumores de xenoinjerto de BCSC1 de ratones tratados con KDM4(i). En conjunto, el tratamiento con KDM4(i) bloqueó el crecimiento del tumor en el modelo de xenoinjerto de BCSC.
- 20 25 30 En resumen, se describe un método de cultivo que permite el aislamiento y el crecimiento de estirpes de BCSC aisladas de tumores de pacientes individuales después de la quimioterapia neoadyuvante. Los xenoinjertos de BCSC de dilución limitante recapitulan fielmente los tumores parentales de los pacientes y las BCSC, los xenoinjertos de BCSC y los tumores parentales comparten un perfil de transcriptoma muy similar. Por lo tanto, estos modelos son herramientas ideales para la identificación y validación de nuevas terapias.
- 35 40 45 Se proporciona un método para identificar de manera selectiva la actividad inhibidora de KDM4 de un compuesto inhibidor de KDM4 en células madre de cáncer de mama primario que comprende las etapas de: (1) obtener material sobre tumores de mama; (2) disociar mecánicamente el material tumoral; (3) tratar el material tumoral con al menos una desoxirribonucleasa, dispasa o termolisin; (4) diluir el material tumoral en tampón; (5) filtrar el material tumoral tratado disociado para obtener células tumorales; (6) eliminar opcionalmente los glóbulos rojos con un tampón de lisis; (7) lavar las células tumorales en medios de cultivo celular; (8) cultivar las células tumorales lavadas en un medio de enriquecimiento de células madre que comprende una relación 1:1 de (a) medio líquido y (b) matriz sólida, en donde (a) comprende: medio basal epitelial mamario, suplemento sin suero, anfotericina, penicilina-estreptomicina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, heparina, gentamicina e inhibidor de la Rho cinasa; (9) incubar el cultivo de enriquecimiento de células madre a 37 °C con poco oxígeno hasta que las células enriquecidas proliferen en forma de esferas; (10) ampliar la población de células que proliferaron como esferas en un medio de expansión que comprende (a) y (b) en una relación 98:2, para obtener células madre de cáncer de mama expandidas; (11) recultivar células madre de cáncer de mama expandidas en un medio de enriquecimiento de células madre que comprende un inhibidor de KDM4, en donde el inhibidor de KDM4 inhibe la capacidad de las células madre de cáncer de mama para proliferar como esferas en comparación con las células madre de cáncer de mama recultivadas sin un inhibidor de KDM4.
- 50 55 Además, las presentes realizaciones no sólo apoyan la búsqueda de miembros de la familia de KDM4 como nuevas dianas terapéuticas, sino que proporcionan un nuevo inhibidor de KDM4 con características preclínicas únicas que bloquea la proliferación de las BCSC *in vitro* e *in vivo* al dirigirse a la vía del EGFR. Por tanto, la modulación de la actividad de KDM4 es una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de cánceres tales como, en particular, el cáncer de mama resistente a la quimioterapia. El Compuesto I, el ácido 3-[(1*R*)-6-[metil(fenil)amino]-1,2,3,4-tetratidronaftalen-1-il]metil]amino)piridin-4-carboxílico, es un ejemplo específico de un compuesto derivado de piridina sustituido que comprende un anillo de piridina disustituido que lleva en la posición 4 un ácido carboxílico y en la posición 3 un grupo amino sustituido. Este y los derivados de piridina sustituidos relacionados se proporcionan en el documento WO 2015/200709.
- 60 La invención se refiere a un compuesto, o a un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la fórmula: ácido 3-[(4*R*)-7-[metil[4-propan-2-il]fenil]amino]-3,4-dihidro-2*H*-1-benzopiran-4-il]metil]amino)piridin-4-carboxílico, representado por la estructura:



10 para su uso en la inhibición de un cáncer asociado con la actividad lisina desmetilasa 4 (KDM4), en donde el cáncer asociado a KDM4 se selecciona de cáncer de mama triple negativo, cáncer de colon, linfoma de Burkitt o leucemia mieloide aguda.

El cáncer asociado a KDM4 puede ser un cáncer de mama triple negativo.

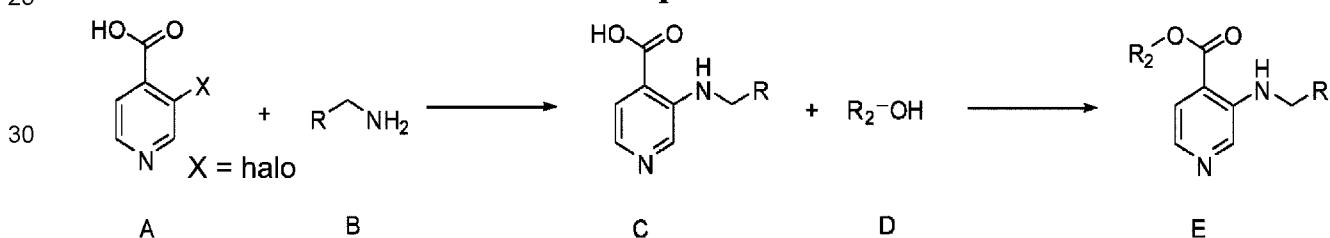
15 El cáncer asociado a KDM4 puede ser un cáncer de colon

El cáncer asociado a KDM4 puede ser un linfoma de Burkitt

El cáncer asociado a KDM4 puede ser una leucemia mieloide aguda.

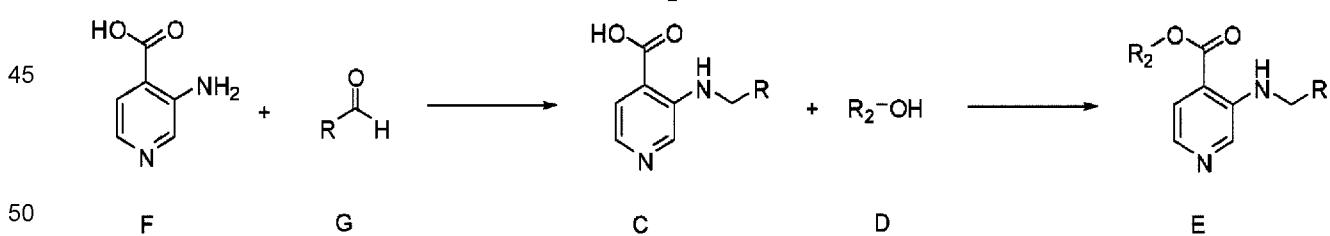
Los compuestos derivados de piridina sustituidos se preparan por las rutas de síntesis generales que se describen a continuación en los Esquemas 1-3.

Esquema 1



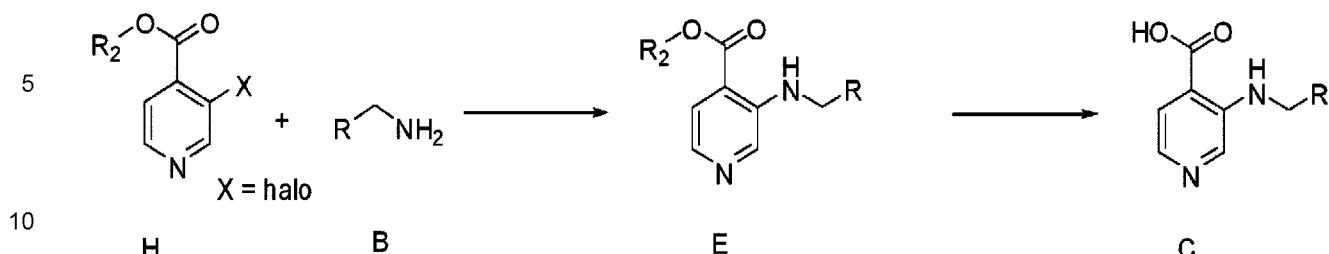
35 Con referencia al Esquema 1 anterior, el compuesto **A** y un compuesto de amina **B** se mezclan y se tratan en una variedad de condiciones para formar el compuesto **C**. Por ejemplo, la mezcla del compuesto **A** y una amina **B** se puede someter a irradiación de microondas en un disolvente apropiado, a temperaturas que varían de 120 °C a 172 °C. El compuesto éster **E** se puede preparar a partir del compuesto **C** y un alcohol **D** mediante el uso de un reactivo de acoplamiento, tal como HATU, en presencia de una base.

Esquema 2



55 Con referencia al Esquema 2 anterior, el compuesto **F** y un compuesto de aldehido **G** se mezclan y se tratan en condiciones de aminación reductora para formar el compuesto **C**. El compuesto éster **E** se puede preparar a partir del compuesto **C** y un alcohol **D** mediante el uso de un reactivo de acoplamiento, tal como HATU, en presencia de una base.

Esquema 3



Con referencia al Esquema 3, el compuesto **H** y un compuesto de amina **B** se mezclan y se tratan en una variedad de condiciones para formar el compuesto **E**. Por ejemplo, la mezcla del compuesto **H** y una amina **B** puede someterse a una reacción de Buchwald bajo radiación por microondas en un disolvente apropiado, a temperaturas que varían de 100 °C a 120 °C. El compuesto éster **E** se puede hidrolizar para dar el compuesto **C**, mediante el uso de condiciones básicas, tal como NaOH acuoso 1 N.

Los compuestos de KGM4(i) descritos en la presente descripción pueden producirse o proporcionarse como una sal farmacéuticamente aceptable. Una sal farmacéuticamente aceptable de uno cualquiera de los compuestos de KGM4(i) derivados de piridina sustituidos pretende abarcar cualquier y todas las formas de sal farmacéuticamente adecuadas, que incluyen sales farmacéuticamente aceptables tales como sales de adición de ácidos y bases, como son bien conocidas en la técnica.

Típicamente, el compuesto derivado de piridina sustituido ejemplificado por el Compuesto I es sustancialmente puro, ya que contiene menos de aproximadamente 5 %, o menos de aproximadamente 1 %, o menos de aproximadamente 0,1 %, de otras moléculas pequeñas orgánicas, tales como productos intermedios o subproductos de síntesis sin reaccionar que se generan, por ejemplo, en una o más de las etapas de síntesis.

Los compuestos de KGM4(i) que se describen en la presente descripción típicamente contienen uno o más centros asimétricos y, por tanto, pueden dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoquímicas que se definen, en términos de estereoquímica absoluta, como (R) o (S). Asimismo, también se pretende incluir todos los isómeros posibles, así como sus formas racémicas y ópticamente puras y todas las formas tautoméricas. El término “isómero de posición” se refiere a los isómeros estructurales alrededor de un anillo central, tales como orto-, meta- y para-isómeros alrededor de un anillo de benceno. Un “estereoísmo” se refiere a un compuesto formado por los mismos átomos unidos por los mismos enlaces pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes, que no son intercambiables. Los estereoísmos se pueden separar por medios y métodos conocidos en la técnica, tales como HPLC quiral. Por ende, los compuestos de KGM4(i) proporcionados en la presente descripción abarcan los diversos estereoísmos y sus mezclas e incluye “enantiómeros”, que se refiere a dos estereoísmos cuyas estructuras moleculares son imágenes exactas no superponibles entre sí. Adicionalmente, un “tautómero” se refiere a una molécula en donde es posible un cambio de protones de un átomo de una molécula a otro átomo de la misma molécula. Los compuestos de KGM4(i) presentados en la presente descripción pueden, en determinadas realizaciones, existir como tautómeros. En circunstancias en las que es posible la tautomerización, puede existir un equilibrio químico de los tautómeros, pero la relación exacta de los tautómeros depende de factores como el estado físico, la temperatura, el disolvente y el pH.

En consecuencia, y tal como se usa en la presente descripción, una referencia a KGM4(i), compuesto de KGM4(i), o Compuesto I, y similares, incluye dentro de esa referencia una sal, hidrato, solvato, N-óxido, estereoísmo o tautómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

En ciertos casos, el compuesto de KGM4 (i) derivado de piridina sustituido se puede administrar como un compuesto puro. En otras realizaciones y en general, el compuesto de KGM4 (i) se combina con un portador farmacéuticamente aceptable (también denominado en la presente descripción excipiente farmacéuticamente adecuado (o aceptable), excipiente fisiológicamente adecuado (o aceptable) o portador fisiológicamente adecuado (o aceptable)) que se selecciona sobre la base de una vía elegida de administración y práctica farmacéutica estándar. Véase, p. ej., REMINGTON: SCIENCE & PRACTICE OF PHARMACY 21^a Ed. (Gennaro (Ed.) Mack Pub. Co., Easton, Pensilvania (2005)).

En consecuencia, en la presente descripción se proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de KGM4(i) derivado de piridina sustituido, o un estereoísmo, sal, hidrato, solvato o N-óxido farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. El portador o los portadores (o excipiente(s)) es(son) aceptable(s) o adecuado(s) si el portador es compatible con los otros ingredientes de la composición y no es perjudicial para el sujeto receptor. Una realización proporciona una composición farmacéutica que comprende el Compuesto I.

Las referencias a "agente farmacéutico", "agente terapéutico", "farmacéuticamente activo", "farmacéutico", "fármaco", "medicamento", "agente activo", "fármaco activo", "ingrediente farmacéutico activo" y similares, se refieren en un sentido general a sustancias útiles en las técnicas médicas y científicas, que incluyen, por ejemplo, fármacos, productos biológicos, agentes de diagnóstico (p. ej., colorantes o agentes de contraste) u otras sustancias utilizadas con fines terapéuticos, de diagnóstico o preventivos (p. ej., vacunas) o de investigación. Ejemplos de agentes farmacéuticos incluyen moléculas pequeñas, agentes quimioterapéuticos, agentes de contraste, anestésicos, ARN interferentes, vectores génicos, productos biológicos, inmunógenos, antígenos, interferones, preparaciones de anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, insulinas o combinaciones de cualquiera de estos. Como se ha indicado, una composición farmacéutica o formulación farmacéutica puede comprender uno o más agentes terapéuticos activos, o una combinación de agentes activos y de diagnóstico, etc., que típicamente comprenden además un excipiente o excipientes adecuados.

Además, una composición farmacéutica tal como se describe en la presente descripción puede formularse para que sea compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, p. ej., intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p. ej., inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosal y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol benzílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede contenerse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J., EE. UU.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición ha de ser estéril y debe ser fluida en la medida en que sea fácil de administrar con una jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y ha de conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluididad adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, resultará preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de una esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son el secado al vacío y la liofilización, lo que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada de forma estéril del mismo.

Para administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de aerosol de un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, p. ej., un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

La administración sistémica también puede realizarse por medios transmucosos o transdérmicos. Para administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal puede lograrse mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas, tal como se conoce generalmente en la técnica. Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (p. ej., con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para suministro rectal.

A este respecto, el Compuesto I de KDM4(i) se administró eficazmente mediante administración oral en los Ejemplos descritos en la presente memoria. Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden ser contenidas en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para fines de administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un portador fluido

- para su uso como enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica por vía oral y se agita y se expectora o se traga. Pueden incluirse agentes aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa; un agente disgregante tal como ácido algínico, PRIMOJEL® (almidón glicolato de sodio, DFE pharma) o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio, estearato de calcio, palmitoestearato de glicerilo o behenato de glicerilo; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante como menta, salicilato de metilo o aromatizante de naranja. Por lo tanto, una composición farmacéutica ilustrativa puede formularse en formas de dosificación oral adecuadas incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, sobres o cápsulas de gelatina dura o blanda, metilcelulosa u otro material adecuado fácil de disolver en el tracto digestivo. En algunas realizaciones, se usan portadores sólidos no tóxicos adecuados que incluyen, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. Véase, p. ej., REMINGTON, 2005.
- Por ejemplo, se prepara un comprimido mediante la mezcla del 48 % en peso del Compuesto I, 45 % en peso de celulosa microcristalina, 5 % en peso de hidroxipropilcelulosa de baja sustitución y 2 % en peso de estearato de magnesio. Los comprimidos pueden prepararse por compresión directa. El peso total de este ejemplo de comprimidos fabricados por compresión se mantiene en 250-500 mg. Las dosis orales pueden variar típicamente de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 1000 mg, de una a cuatro veces, o más, por día.
- En un ejemplo, los compuestos de KDM4 (i) se preparan con portadores que protegerán el compuesto frente a la eliminación rápida del organismo, como formulaciones de liberación sostenida/controlada, que incluyen implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliorthoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones resultarán evidentes para los expertos en la materia. Por ejemplo, los principios activos pueden quedar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.
- Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida, y los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente estadounidense N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etyl-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como LUTPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Si bien los polímeros como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Dichos materiales también se pueden obtener en el mercado (p. ej., Alza Corp.; Nova Pharm., Inc.). También pueden usarse suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales) como portadores farmacéuticamente aceptables. Estas preparaciones se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la materia.
- Las composiciones orales o parenterales pueden formularse en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación, como se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación descritas en este caso viene dictada y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se va a lograr, y de las limitaciones inherentes a la técnica de componer dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.
- Las composiciones farmacéuticas o unidades de dosificación pueden incluirse en un recipiente, paquete o dispensador junto con las instrucciones de administración.
- La formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten negativamente entre sí. Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente que mejora su función, tal como, por ejemplo, un agente inmunoestimulador, un agente quimioterapéutico, una citocina, un anticuerpo o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Una “formulación farmacéutica”, “formulación” o “composición farmacéutica” se refiere a un producto farmacológico que incluye al menos un agente activo y puede incluir además al menos un excipiente, portador, tampón, estabilizador u otro material farmacéuticamente aceptable bien conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, una formulación farmacéutica inyectable típica incluye una solución acuosa aceptable por vía parenteral que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Las composiciones farmacéuticas pueden tener utilidad diagnóstica, terapéutica o de investigación en diversas especies, tales como, por ejemplo, en pacientes o sujetos humanos. En al menos una realización, una composición farmacéutica comprende un inhibidor de bromodominio y un agente quimioterapéutico tal como temozolomida, paclitaxel unido a proteínas o romidepsina. Por ejemplo, un inhibidor de bromodominio puede ser 4-[2-(ciclopropilmetilamino)-5-metilsulfonilfenil]-2-metilisoquinolin-1-ona. Los agentes y composiciones descritos en la presente descripción pueden formularse de cualquier manera convencional usando uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables tal como se describe en la bibliografía aceptada. Véase, p. ej., REMINGTON: SCIENCE & PRACTICE OF PHARMACY, 22^a Ed. (Lloyd (Ed.), Pharmaceutical Press, Londres, Reino Unido, 2012). Dichas formulaciones contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes activos descritos en la presente descripción, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para la administración adecuada al sujeto.

Una formulación farmacéutica puede incluir una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente activo. Un experto en la materia puede determinar con facilidad dichas cantidades eficaces basándose, en parte, en el efecto de la forma de dosificación administrada, o en el efecto combinatorio de un agente y uno o más agentes activos adicionales, si se usa más de un agente. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente activo también puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del agente (y uno o más agentes activos adicionales) para provocar una respuesta deseada en el individuo, p. ej., la mejora de al menos un parámetro de la afección. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una forma de dosificación puede inhibir (disminuir la gravedad o eliminar la aparición de), prevenir un trastorno particular o disminuir uno cualquiera de los síntomas de un trastorno particular conocido en la técnica o descrito en la presente descripción. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede ser aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del agente activo o la forma de dosificación sea superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Las composiciones farmacéuticas se administran de una manera apropiada para la afección tratada (véase más adelante). Una dosis apropiada y una duración y frecuencia de administración de dosis adecuadas pueden determinarse basándose en la afección del sujeto, el tipo y la gravedad de la enfermedad del sujeto, la forma particular del compuesto activo y el método de administración. En general, una dosis y un régimen de tratamiento apropiados proporcionan la composición o composiciones activas en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico o profiláctico (p. ej., un resultado clínico mejorado, tal como remisiones parciales o completas más frecuentes, o más tiempo libre de enfermedad o supervivencia general, o una disminución de la gravedad de los síntomas, véase más adelante). Las dosis óptimas generalmente se determinan usando modelos experimentales o ensayos clínicos, y después se ajustan según la masa corporal, el peso o el volumen sanguíneo del sujeto.

En consecuencia, la dosis de la composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de KDM4 (i) derivado de piridina sustituido puede diferir dependiendo de la afección del sujeto (p. ej., un paciente humano), tal como el estadio de la enfermedad, el estado de salud general, la edad y otros factores.

Como se ha indicado, los compuestos de KDM4(i) descritos en este caso se pueden administrar en una terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes, p. ej., agentes terapéuticos, que son útiles para tratar afecciones o trastornos patológicos, tales como diversas formas de cáncer, trastornos autoinmunitarios y enfermedades inflamatorias. La expresión “en combinación” en este contexto significa que los agentes se administran de forma sustancialmente contemporánea, ya sea simultánea o secuencialmente. Si se administran secuencialmente, al inicio de la administración del segundo compuesto, el primero de los dos compuestos es preferiblemente detectable todavía a concentraciones eficaces en el sitio de tratamiento.

Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir uno o más anticuerpos descritos en este caso coformulados con, o coadministrados con, uno o más agentes terapéuticos adicionales, p. ej., uno o más inhibidores de citocinas y factores de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores enzimáticos o agentes citotóxicos o citostáticos. Dichas terapias combinadas pueden utilizar ventajosamente dosis más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias. Por ejemplo, un compuesto de KDM4(i) terapéutico descrito en este caso puede usarse en combinación con un anticuerpo e incluir además aquellos agentes que interfieren en diferentes etapas de una respuesta inflamatoria. Uno o más compuestos de KDM4(i) descritos en la presente descripción pueden coformularse con, o coadministrarse con, uno o más agentes adicionales tales como otros agentes quimioterapéuticos, o productos biológicos tales como vacunas, immunotoxinas, antagonistas de citocinas o factores de crecimiento (p. ej., receptores solubles, inhibidores de péptidos, moléculas pequeñas, fusiones de ligandos); anticuerpos o partes de unión a antígenos de los mismos (p. ej., anticuerpos que se unen a marcadores tumorales, citocinas o factores de crecimiento o sus receptores); y citocinas antiinflamatorias o sus agonistas.

En al menos una realización, un compuesto de KDM4(i) puede coformularse o coadministrarse con al menos un agente quimioterapéutico adicional. El agente quimioterapéutico puede ser un inhibidor de bromodominio (véase, p. ej., el

documento WO 2015058160); Publicación de patente N.º US 20150111885; Patente estadounidense N.º 9.034.900), un agente alquilante o un inhibidor mitótico.

- 5 Por consiguiente, un agente activo (es decir, el compuesto de KDM4(i)) se puede administrar a un sujeto como monoterapia, o como una terapia de combinación con otro agente activo en una forma de dosificación combinada, o como un tratamiento adicional, p. ej., otro tratamiento para el mismo trastorno, un trastorno asociado o adicional. Por ejemplo, un compuesto de KDM4(i) puede combinarse con un agente quimioterapéutico, tal como un inhibidor de bromodominio, romidepsina, temozolomida, paclitaxel unido a proteínas y similares, en la misma formulación o en una formulación diferente administrada simultánea o secuencialmente. Adicionalmente, la terapia de combinación puede 10 incluir la administración al sujeto (p. ej., un paciente humano) de uno o más agentes (p. ej., antibióticos, anticoagulantes, antihipertensivos o fármacos antiinflamatorios) que proporcionan un beneficio terapéutico al sujeto. En otro ejemplo, la terapia de combinación puede incluir la administración al sujeto de un compuesto de KDM4(i) y uno o más agentes adicionales que proporcionan un beneficio terapéutico a un sujeto que tiene cáncer, tal como 15 cáncer de mama triple negativo o refractario. De manera similar, en otro ejemplo, la terapia de combinación puede incluir administrar al sujeto un compuesto de KDM4(i), paclitaxel unido a proteínas o una combinación que comprende un compuesto de KDM4(i) y paclitaxel, y uno o más agentes adicionales que proporcionan un beneficio terapéutico a un sujeto que tiene cáncer. En otras realizaciones, un agente activo se administra primero y un agente o agentes 20 activos adicionales se administran en segundo lugar. En algunas realizaciones, se administran uno o más agentes activos adicionales al mismo tiempo, pero usando diferentes dispositivos de suministro o modos de suministro de fármacos, por ejemplo, proporcionando una terapia de combinación que comprende la administración de un compuesto de KDM4(i) y temozolomida, o que comprende un compuesto de KDM4(i) y paclitaxel, o que comprende un compuesto de KDM4(i) y romidepsina. En al menos una realización, el compuesto de KDM4(i) es el Compuesto I.
- 25 Los cánceres que pueden tratarse con una terapia que incluye la administración de compuestos de KDM4(i) incluyen carcinoma, sarcoma, tumor de células germinales, linfoma o leucemia, blastoma u otros cánceres. Los carcinomas incluyen neoplasias epiteliales y glandulares, carcinoma de células de transición, carcinoma quístico adenoide, insulinoma, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, tumor carcinoide del apéndice, linitis plástica, carcinoma de laringe, carcinoma de hipofaringe, cáncer de boca, cáncer de hipofaringe, carcinoma de glándulas salivales, carcinoma de lengua, carcinoma gástrico, prolactinoma, oncocitoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma del parénquima renal, 30 carcinoma renal papilar, carcinoma de la vesícula biliar, carcinoma bronquial, tumor de Grawitz, carcinoma de sitio primario desconocido, adenomas endocrinos múltiples, adenoma endometrioides, neoplasias anexiales y de apéndices cutáneos, neoplasias mucoepidermoides, neoplasias quísticas, mucinosas y serosas, cistadenoma, pseudomixoma peritoneal, neoplasias ductales, lobulares y medulares, neoplasias de células acinares, neoplasias epiteliales complejas, tumor de Warthin, timoma, neoplasias gonadales especializadas, tumor del estroma del cordón sexual, 35 carcinoma labial de tumor sólido, tumor de células de la granulosa, arrenoblastoma, tumor de células de Sertoli Leydig, tumores glómicos, paraganglioma, feocromocitoma, tumor glómico, nevus melanocítico. Los sarcomas incluyen tumor de Askin, botriodies, sarcoma de Ewing, sarcoma de Kaposi, hemangioendotelioma maligno, schwannoma maligno, osteosarcoma, sarcomas de tejidos blandos (incluyendo sarcoma alveolar de partes blandas, angiosarcoma, cistosarcoma filoides, dermatofibrosarcoma, tumor desmoide, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, 40 sarcoma epitelioide, condrosarcoma extraesquelético, osteosarcoma extraesquelético, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, linfangiosarcoma, linfosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, neurofibrosarcoma y sarcoma sinovial). El linfoma y la leucemia incluyen leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia de células pilosas, mieloma múltiple y leucemia mielógena crónica; trastornos mieloproliferativos crónicos; leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, linfoma linfoplasmocítico (como 45 macroglobulinemia de Waldenstrom), linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, enfermedades por depósito de inmunoglobulinas monoclonales, enfermedades de cadena pesada, linfoma de linfocitos B de la zona marginal extraganglionar, también llamado linfoma de malt, linfoma de linfocitos B de la zona marginal ganglionar, linfoma de Burkitt, linfoma de no Hodgkin (incluyendo linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, micosis fungoide y síndrome de Sézary, linfoma de células del manto, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma primario de efusiones, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma hepatoesplénico de linfocitos T, linfoma extraganglionar de células NK-T), linfoma mediastínico (tímico) de linfocitos B grandes, leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfocítica granular de linfocitos T grandes, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de linfocitos T de adultos, linfoma de linfocitos T de tipo enteropatía, linfoma blástico de células NK, linfoma cutáneo de linfocitos T; trastornos linfoproliferativos de linfocitos T CD30 positivas 50 cutáneas primarias, linfoma cutáneo anaplásico primario de células grandes, papulosis linfomatoide, linfoma angioimmunoblastico de linfocitos T, linfoma periférico de linfocitos T, linfoma anaplásico de células grandes no especificado, linfomas de Hodgkin clásicos (linfoma de Hodgkin de esclerosis nodular, celularidad mixta, rico en linfocitos, con o sin depleción de linfocitos, con predominio de linfocitos nodulares), linfoma relacionado con el VIH (p. ej., linfoma primario de efusiones). Los tumores de células germinales incluyen, sin limitación, germinoma, disgerminoma, tumor de células germinales no germinomatoso, tumor del seno endodérmico, tumor extracranial de células germinales; tumor extragonadal de células germinales, teratoma, poliembrionia y gonadoblastoma. Los blastomas incluyen ependimoblastoma, estesioneuroblastoma y nefroblastoma.
- 55 Otros cánceres que pueden tratarse con terapias que incluyen la administración de compuestos de KDM4(i) incluyen cánceres de pulmón como cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de pulmón microcítico (incluyendo carcinoma de células pequeñas (cáncer de células de avena), carcinoma mixto de células pequeñas y grandes y carcinoma 60

- combinado de células pequeñas), cáncer de hígado, cáncer gástrico, glioblastoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, mieloma y carcinoma de la corteza suprarrenal; cáncer de tiroides (carcinoma tiroideo medular y papilar), carcinoma renal, carcinoma de cuello uterino, carcinoma del cuerpo uterino, carcinoma de endometrio, carcinoma de corion, carcinoma de testículos, carcinoma urinario, melanoma, basalioma, teratoma, melanoma coroideo, craneofaringeoma, osteosarcoma, miosarcoma y plasmocitoma, cáncer anal; cáncer de apéndice; tumor teratoideo/rabdoide atípico; cáncer de vejiga; tumor cerebral (incluyendo glioma del tronco encefálico, tumor teratoideo/rabdoide atípico del sistema nervioso central, tumores embrionarios del sistema nervioso central, craneofaringioma, ependimoma, medulopatelioma, tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineoblastoma); cáncer de mama; tumores bronquiales; 5 cáncer de sitio primario desconocido; tumor carcinoide; tumor teratoideo/rabdoide atípico del sistema nervioso central; tumores embrionarios del sistema nervioso central; cánceres infantiles; tumores de células de los islotes del páncreas endocrino; cáncer de endometrio; cáncer de vías biliares extrahepáticas; cáncer de vesícula biliar; cáncer gástrico (estómago); tumor carcinoide gastrointestinal; tumor de células del estroma gastrointestinal; tumor del estroma gastrointestinal (GIST); tumor trofoblástico gestacional; cáncer de cabeza y cuello; cáncer de corazón; melanoma intraocular; tumores de células de los islotes; histiocitosis de células de Langerhans; cáncer de laringe; cáncer de labio; cáncer de hígado; histiocitoma fibroso maligno, cáncer de huesos; medulopatelioma; carcinoma de células de Merkel; cáncer de cuello escamoso metastásico con primario oculto; síndromes de neoplasia endocrina múltiple; 10 mieloma múltiple; mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas; síndromes mielodisplásicos; neoplasias mieloproliferativas; cáncer de cavidad nasal; cáncer nasofaríngeo; cáncer de cavidad bucal; cáncer orofaríngeo; osteosarcoma; otros tumores cerebrales y de la médula espinal; cáncer epitelial de ovario; tumor de células germinales de ovario; tumor ovárico de bajo potencial maligno; papilomatosis; cáncer de seno paranasal; cáncer de paratiroides; cáncer pélvico; cáncer de pene; tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia; pineoblastoma; tumor 15 hipofisario; neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple; blastoma pleuropulmonar; linfoma primario del sistema nervioso central (SNC); cáncer de recto; cáncer renal; cáncer del tracto respiratorio; cáncer de intestino delgado; cáncer de cuello escamoso; tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; carcinoma tímico; timoma; cáncer 20 de tiroides; cáncer de células de transición; cáncer de células de transición de la pelvis renal y el uréter; tumor trofoblástico; cáncer de uréter; cáncer de uretra; sarcoma uterino; cáncer de vagina; cáncer de vulva.
- Los ejemplos específicos de cánceres asociados con tumores duros que pueden tratarse con compuestos de KDM4(i) 30 derivados de piridina sustituidos incluyen cáncer de mama, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rhabdomiosarcoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de páncreas (como glucagonoma, gastrinoma, tumor neuroendocrino pancreático (VIPoma)), cáncer de huesos, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer bucal, cáncer 35 nasal, cáncer de garganta, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de testículo, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, tumores 40 cerebrales (como glioblastoma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meningioma, meduloblastoma y tumores neuroectodérmicos periféricos), craneofaringioma ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendrogloma, meningioma, cáncer de piel, melanoma (melanoma maligno, melanoma nodular, nevus displásico, melanoma lentigo maligno, melanoma de extensión superficial y melanoma maligno lentiginoso acral), neuroblastoma y retinoblastoma. En particular, los compuestos de KDM4(i) pueden ser útiles en el tratamiento de cánceres asociados 45 a la vía del EGFR.
- Los agentes quimioterapéuticos a menudo se caracterizan por su funcionalidad, estructura química y relación con otro fármaco. Los agentes quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo: agentes alquilantes (p. ej., azacitidina, mostazas 50 nitrogenadas: mecloretamina, clorambucilo, ciclofosfamida (CYTOXAN®), ifosfamida, bendamustina (LEVACT®) y melfalán; nitrosoureas: estreptozocina, carbustina (BCNU), lomustina y biscloroetilnitrosurea; alquilsulfonatos: busulfán, triazinas: dacarbazine (DTIC) y temozolomida (TEMODAR®); etiléniminas: tiotepa y altretamina (hexametilmelamina); fármacos con platino (como cisplatino, carboplatino, satraplatino (JM-216), CI-973 y oxalaplatino); antimetabolitos (p. ej., 5-fluorouracilo (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), capecitabina (XELODA®), 55 citarabina (ARA-C®), azacitidina, decitabina (DACOGEN®, 5-aza-2'-desoxi-citidina, un análogo de la citidina y agente hipometilante), flouxuridina, fluxuridina, darabina, gemcitabina (GEMZAR®), hidroxiurea, metotrexato y permetrexed (ALIMTA®); antraciclinas (p. ej., daunorrubicina (daunomicina, rubidomicina o cerubidina), doxorubicina (ADRIAMYCIN®), epirubicina, idarrubicina, actinomicina-D, bleomicina; mitomicina-C y mitoxantrona (que también actúa como un inhibidor de la topoisomerasa II); inhibidores de la topoisomerasa (p. ej., inhibidores de la topoisomerasa I: topotecán, irinotecán (CPT-11); inhibidores de la topoisomerasa II: etopósido (VP-16), camptotecina, tenipósido y mitoxantrona); inhibidores mitóticos (p. ej., taxanos: paclitaxel (TAXOL®) y docetaxel (TAXOTERE®)); 60 epotilones: ixabepilona (IXEMPRA®); alcaloides de la vinca tales como: vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®) y vinorelbina (NAVELBINE®); estramustina (EMCYT®); antagonistas de purina o pirimidina tales como 6-mercaptopurina, 5-fluorouracilo, citarabina, clofarabina y gemcitabina; agentes de maduración celular (p. ej., trióxido de arsénico y tretinoína); inhibidores de las enzimas reparadoras del ADN (p. ej., podofilotoxinas, etopósido, irinotecán, topotecán y tenipósido); enzimas que impiden la supervivencia celular (p. ej., asparaginasa y pegaspargasa); 65 corticosteroides (p. ej., prednisona, metilprednisolona (SOLUMEDROL®) y dexametasona (DECADRON®));

- 5 inhibidores de la HDAC (p. ej., romidepsina (ISTODAX®), vorinostat (ZOLINZA®)); otros antimetabolitos tales como L-asparaginasa (ELSPA®), 2-desoxi-D-glucosa, procarbazina (MATULANE®) y bortezomib (VELCADE®); otros agentes citotóxicos (p. ej., fosfato de estramustina, prednimustina y procarbazina); hormonas (p. ej., tamoxifeno, leuproliida, flutamida y megestrol); agonistas o antagonistas hormonales, agonistas parciales o antagonistas parciales); anticuerpos monoclonales (p. ej., gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®), inotuzumab ozogamicina (CMC-544), alemtuzumab, rituximab e itrio-90-ibritumomab tiuxetan); inmunomoduladores (p. ej., talidomida y lenalidomida); inhibidores de la cinasa tales como los inhibidores de la cinasa Bcr-Abl (p. ej., AP23464, AZD0530, CGP76030, PD180970, SKI-606, imatinib, dasatinib (BMS354825), nilotinib (AMN107) y VX680/MK-0467 (inhibidor de la cinasa Aurora)).
- 10 10 Otras terapias contra el cáncer que pueden combinarse con terapia con inhibidores de BET incluyen cirugía, radioterapia (p. ej., radiación gamma, radioterapia con haz de neutrones, radioterapia con haz de electrones, terapia de protones, braquiterapia e isótopos radiactivos sistémicos), terapia endocrina, modificadores de la respuesta biológica (p. ej., interferones, interleucinas y factor de necrosis tumoral), hipertermia y crioterapia y agentes para atenuar cualquier efecto adverso (p. ej., antieméticos).
- 15 20 La referencia a un agente quimioterapéutico en la presente descripción se aplica al agente quimioterapéutico o a sus derivados y, por consiguiente, la invención contempla e incluye cualquiera de estas realizaciones (agente; agente o derivado(s)). Los “derivados” o “análogos” de un agente quimioterapéutico u otro resto químico incluyen, aunque sin limitación, compuestos que son estructuralmente similares al agente o resto quimioterapéutico o que están en la misma clase química general que el agente o resto quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el derivado o análogo del agente o resto quimioterapéutico conserva propiedades químicas o físicas similares (incluida, por ejemplo, la funcionalidad) del agente o resto quimioterapéutico.
- 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 1049

expresión agente terapéutico incluye, p. ej., agentes terapéuticos convencionales de bajo peso molecular comúnmente denominados fármacos de moléculas pequeñas; y productos biológicos que incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos o partes funcionalmente activas de los mismos, péptidos, lípidos, fármacos proteicos, conjugados de proteínas y fármacos, proteínas de fusión, enzimas, ácidos nucleicos, ribozimas, material genético, virus, bacterias, 5 células eucariotas y vacunas. Un agente terapéutico también puede ser un profármaco. Un agente terapéutico también puede ser un isótopo radiactivo. Un agente terapéutico puede ser un agente activado por una forma de energía tal como la luz o la energía ultrasónica, o activado por otras moléculas circulantes que pueden administrarse sistémica o localmente. De manera adicional, el agente terapéutico puede formularse farmacéuticamente.

10 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Estirpes de células madre de cáncer de mama

15 El material sobre tumores de cáncer de mama de pacientes se obtuvo del departamento de patología del Centro Médico Universitario de Friburgo con el consentimiento de la paciente (votación de ética 307/13). Todos los tumores primarios procedían de sujetos que habían recibido quimioterapia antes de la recolección de tejido y se clasificaron como triple negativo. Todas las cirugías fueron realizadas por el Departamento de Obstetricia y Ginecología del Centro Médico Universitario de Friburgo. Los especímenes de tejido tumoral para el injerto y la incrustación en parafina se obtuvieron simultáneamente a través de patólogos del banco de tumores del Centro Oncológico Integral de Friburgo. 20 Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todas las pacientes antes de su inclusión en los estudios descritos en la presente descripción.

25 Las estirpes de células madre de cáncer de mama primario (BCSC) se aislaron mediante disociación mecánica del material tumoral y digestión enzimática en 5 ml de tampón PBS (DPBS) de Dulbecco (GIECO® media, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EE. UU.) complementado con 6 U de desoxirribonucleasa I (MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Alemania) y 1 mg de LIBERASE™ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, el medio de digestión se diluyó con 10 ml de DPBS y se filtró a través de un filtro celular (40 µm, Becton Dickinson, Carlsbad, California, EE. UU.), y los grumos de tejido restantes se rompieron con un pistón de una jeringa de 2 ml. Tras la centrifugación a 200 g durante 5 min, se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se lavó una vez con medio MEBM (GIBCO). Si los glóbulos rojos eran visibles en el sedimento, se añadió 1 ml de tampón de lisis ACK (GIBCO) al sedimento celular. Tras 1 minuto de incubación a temperatura ambiente, se añadieron hasta 6 ml de MEBM y la preparación se centrifugó a 200 g durante 5 min. Una vez desechado el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 1 ml de MEBM y se filtró a través de un filtro de 40 µm. Tras la centrifugación a 200 g durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó y el sedimento celular restante se recogió en 30 un medio de células madre mamarias (MSC, véase más adelante). Las células se contaron en una cámara de Neubauer (hemocitómetro) y, a continuación, se colocaron en placas en una placa de 24 pocillos de baja adherencia (CORNING®, Corning, NY, EE. UU.) a razón de 2×10^4 células por pocillo en una mezcla 1: 1 enfriada con hielo de medio de MSC y matriz de MATRIGEL® (CORNING, n.º 354230). Tras la solidificación de MATRIGEL a 37 °C durante 35 30 min, cada pocillo se cubrió con 500 µl de medio de MSC. Las células se cultivaron a 37 °C en condiciones de bajo contenido de oxígeno (3 % de O₂, 5 % de CO₂, 92 % de N₂). Cuando las células proliferaron de forma estable en 3D, 40 se cultivaron en un cultivo 2D para la expansión celular.

45 La base del medio de MSC (células madre mamarias) descrito en la presente descripción es el medio basal epitelial mamario (GIBCO, n.º 31331-028), complementado con el complemento de cultivo celular sin suero B27® (GIBCO, n.º 17504-044), anfotericina B (SIGMA-ALDRICH, n.º A2942) y penicilina-estreptomicina (GIBCO, n.º 15140122). Este medio se complementó adicionalmente con el factor de crecimiento epidérmico (f.c. 20 ng/ml, n.º AF-100-15, PeproTech, Rocky Hill, N.J., EE. UU.), heparina (f.c. 4 µg/ml, Sigma-Aldrich n.º H3149), factor de crecimiento de fibroblastos (f.c. 20 ng/ml, PeproTech n.º AF-100-18B), gentamicina (f.c. 35 µg/ml, GIBCO n.º 15750-045) e inhibidor de la Rho cinasa (f.c. 500 nM, CALBIOCHEM® n.º 555550, Merck KGaA, Darmstadt, Dinamarca) para completar el medio de MSC.

55 Para cultivar las BCSC como esferas en un entorno 3D, se sembraron 2×10^4 células por pocillo de una placa de 24 pocillos de baja adherencia en 100 µl de una mezcla 1:1 de MATRIGEL:medio de MSC. Tras la solidificación del MATRIGEL a 37 °C durante 30 min, la placa se cubrió con 500 µl de medio de MSC. Las células se cultivaron en condiciones de bajo contenido de oxígeno como se ha descrito anteriormente. Se añadió 1 ml de medio de MSC después de 2 días. Las células se dividieron semanalmente usando CORNING Dispase para la disolución residual de MATRIGEL y la solución de desprendimiento celular ACCUTASE® (Innovative Cell Technologies, Inc., San Diego, California, EE. UU.) para la disociación de las esferas. Las células se contaron mediante una cámara de Neubauer.

60 Para expandir las BCSC en un entorno 2D, se sembraron 4×10^5 células por placa de cultivo de 10 cm en 2 ml de medio de MSC que contenía MATRIGEL al 2 % (enfriado con hielo). Tras la solidificación del MATRIGEL a 37 °C durante 30 min, la placa se cubrió con 8 ml de medio de MSC. Las células se cultivaron en condiciones de bajo contenido de oxígeno como se ha descrito anteriormente. El medio se cambió después de 3 días. Las células se dividieron semanalmente usando ACCUTASE para su desprendimiento y recuento antes de su nueva siembra.

Las preparaciones adenovíricas de título alto se obtuvieron de Vector BioLabs (Malvern, Pa, EE. UU.). Se añadieron partículas adenovíricas (en medio de MSC) a una multiplicidad de infección (MOI) de 300 para las células BCSC1 y a una MOI de 150 para las células BCSC2.

5 Ejemplo 2: Ensayos in vitro

Para el ensayo de esferoides con células madre cancerosas en metilcelulosa, las células se desprendieron mediante una solución ACCUTASE y se contaron. Se sembraron 3×10^3 células BCSC1 individuales y 1×10^3 células BCSC2 individuales en pocillos individuales de placas de 96 pocillos de adherencia ultrabaja (CORNING, n.º 3474) en medio de MSC sin suero que contenía un 1 % de metilcelulosa (Sigma-Aldrich, n.º M0512). Después de 7 días, se contaron todas las esferas de más de cuatro células para determinar su capacidad de formación de esferas y se contaron las esferas de más de 50 μm de diámetro tanto para las células tratadas con KDM4(i) como para las de control.

10 Para el ensayo de esferoides con células madre cancerosas en la matriz de MATRIGEL, las células se desprendieron mediante una solución ACCUTASE y se contaron. Se sembraron 1×10^3 por triplicado y 4×10^4 células BCSC1 y BCSC2 individuales en MATRIGEL al 50 % en pocillos individuales de placas de 96 pocillos de adherencia ultrabaja en medio de MSC. Las concentraciones de KDM4(i) son las indicadas en las figuras. Después de 7 días, se contaron las esferas de más de 50 μm de diámetro tanto para las células tratadas con KDM4(i) como para las de control en los pocillos con 1×10^3 células. Los pocillos con 4×10^4 células se dividieron como se describe y se contaron; a partir de estas 4×10^4 células, se sembraron 1×10^3 células BCSC1 individuales y BCSC2 individuales por triplicado como se describe en la presente descripción para evaluar la formación de esferas secundarias sin la presencia de un inhibidor.

15 Para los ensayos de dosis-respuesta, las células se desprendieron mediante disociación en solución ACCUTASE y se contaron. Los pocillos de una placa negra de 384 pocillos (Greiner Bio-One, Monroe, N.C., EE. UU.) se recubrieron con 10 μl de medio de MSC que contenía MATRIGEL al 2 % (354230, Corning). Después de la incubación a 37 °C durante 30 min para solidificar MATRIGEL, se sembraron 1×10^3 células individuales por 384 pocillos en un medio de 40 μl . Después de 24 horas en condiciones de cultivo normales, se añadió el inhibidor de KDM4(i) (Compuesto I, Celgene Quanticel Research, Inc.) en 50 μl a cada pocillo hasta las concentraciones finales indicadas. Tras 96 horas de incubación en condiciones de cultivo normales, las células se lavaron una vez con PBS y se fijaron con metanol enfriado con hielo durante al menos 15 min a -20 °C. Tras otra etapa de lavado con PBS, las células se tiñeron con DAPI (Sigma-Aldrich) y se leyeron con la plataforma de formación de imágenes basada en el microscopio ScanR (Olympus Deutschland GmbH, Hamburgo, Alemania). Se determinaron los recuentos nucleares totales de células DAPI por pocillo.

20 25 30 35 40 45 Para los ensayos de proliferación celular, se usaron BCSC etiquetadas con una señal fluorescente NLS-mCherry estable (péptido de localización nuclear) para este ensayo. Las células se desprendieron por disociación con ACCUTASE y se contaron. Cada pocillo de una placa negra de 384 pocillos (Greiner) se recubrió con 10 μl de medio de MSC que contenía MATRIGEL al 2 %. Después de la incubación a 37 °C durante 30 min para solidificar el MATRIGEL, se sembraron 1×10^3 células individuales/pocillo en un medio de 40 μl . Después de 24 horas de cultivo normal, se añadió el KDM4(i) en 50 μl a cada pocillo hasta las concentraciones finales indicadas. Posteriormente, se inició la primera lectura con la plataforma de formación de imágenes basada en el microscopio ScanR (Olympus), en la que se evaluaron los núcleos celulares fluorescentes mCherry en nueve sectores de cada pocillo con una humedad del 60 % y un 5 % de CO₂. Esta lectura se repitió cada 24 horas durante 7 días. El análisis se realizó con el software ScanR (Olympus).

50 55 En cuanto al análisis de micromatrices, se aisló el ARN total del material del paciente, los xenoinjertos y las células utilizando el kit universal de purificación de ARN GeneMATRIX (Roboklon GmbH, Berlín, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Los ARN aislados se procesaron con el kit de expresión WT de AMBION™ (Thermo-Fisher) según lo descrito por el fabricante y se hibridaron con los chips de perlas de expresión HT-12 v.4 de ILLUMINA® siguiendo el protocolo estándar (Illumina, Inc., San Diego, Cal. EE. UU.). Los datos de expresión se procesaron y los cuantiles se normalizaron utilizando el paquete R/Bioconductor de Beadarray (PMID: 17586828) v2.22. Véase Dunning y col., Beadarray: R classes & methods for Illumina bead-based data, 23 Bioinformatics 2183 (2007). Sólo se consideraron para el análisis posterior los conjuntos de sondas asignados a EntrezID a través del paquete Bioconductor illuminaHumanv4.db (v1.26). En el caso de múltiples conjuntos de sondas que coincidían con el mismo EntrezID, se seleccionó el conjunto de sondas que tenía el intervalo intercuartílico más alto respectivo en todas las muestras. El dendrograma (véanse las figuras) representa un agrupamiento jerárquico de enlace completo basado en la distancia euclíadiana entre las muestras.

60 65 Los ensayos de KDM4(i) de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizaron esencialmente como se describe. Metzger y col., LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen receptor-dependent transcription, 437 Nature 436 (2005). Las células BCSC1 se cultivaron durante 18 h en ausencia o presencia de 5×10^{-10} M de KDM4(i). Tres días antes de la recolección, las células se infectaron por adenovirus que expresaban ARNh contra KDM4A o ARNh de control desorganizado (Ad-GFP-U6-hKDM4AshRNA y Ad-U6-RNAi-GFP, Vector Biolabs) según las instrucciones del fabricante. La inmunoprecipitación se realizó con anticuerpos específicos, anti-KDM4a (Schuele Lab), n.º 5766, lote 5766), anti-H3K9me3 (n.º C15410056, lote A1675-001P, Diagenode), en GammaBind™ G-Sepharose™ (GE-Healthcare). Las bibliotecas se prepararon a partir de ADN inmunoprecipitado según métodos

convencionales. Las bibliotecas de ChIP-seq se secuenciaron utilizando un HiSeq 2000 (Illumina) y se cartografiaron en el genoma de referencia hg19 utilizando el software Bowtie2 (p. ej., Johns Hopkins Univ., Baltimore, Maryland, EE. UU.). Langmead y col., Ultrafast & memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome, 10 Genome Biol. R25 (2009). Los datos se analizaron más a fondo utilizando el algoritmo de búsqueda de picos MACS 1.41 (análisis basado en modelos de ChIP-Seq) (p. ej., Nat'l Center Biotechnol. Info., U.S. Nat'l Library Med.) utilizando la entrada como control. Zhang y col., Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS), 9 Genome Biol. (2008). Todos los picos con un FDR superior al 1 % se excluyeron del análisis posterior. Las lecturas cartografiadas de forma única se utilizaron para generar los perfiles de intensidad del genoma completo, que se visualizaron utilizando el navegador del genoma Integrative Genomics Viewer (IGV) (p. ej., Broad Inst., Cambridge, Mass. EE. UU.). Thorvaldsdottir y col., Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration, 14 Brief Bioinform. 178 (2013). El software HOMER (p. ej., Univ. Calif. San Diego) se usó para anotar picos, calcular superposiciones entre diferentes archivos de picos y realizar búsquedas de motivos. Heinz y col., Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities, 38 Mol. Cell 576 (2010). Las características genómicas (promotor, exón, intrón, UTR 3' y regiones intergénicas) se definieron y calcularon utilizando la base de datos Reference Sequence (RefSeq) (p. ej., Nat'l Center for Biotechnol. Info., EE. UU. National Library Med.) y el software HOMER.

Para examinar el efecto de la inhibición del KDM4 sobre la progresión del ciclo celular y la apoptosis o necrosis, las estirpes de BCSC 1 y 2 se trataron con KDM4(i) 50 nM durante diferentes puntos de tiempo (24 h, 48 h, 72 h y 96 h). Tras la exposición al fármaco, se recogieron 4×10^5 células y se tiñeron con 50 μ l de yoduro de propidio (PI) utilizando la solución de PI/ribonucleasa (Cell Signaling Technol. n.º 4087), según las instrucciones del fabricante. Las células se analizaron usando el software BD LSR Fortessa y BD FACS Diva (Becton Dickinson). El porcentaje de células en las fases SubG1, G0/G1, S y G2/M se determinó a partir de 1×10^5 células sin separar utilizando el software FlowJo v6.

Para analizar la expresión de los marcadores establecidos de células madre de cáncer, las células se desprendieron y se contaron como se describió anteriormente. Se lavaron 1×10^5 células con tampón FACS (PBS + BSA al 1 %) y se tiñeron durante 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad con los siguientes anticuerpos diluidos en tampón FACS: anti-CD24 (eBioscience, 46-0247; 1:100), anti-CD44 (eBioscience, 12-0441-81; 1:1000), anti-EPCAM (eBioscience, 660 50-9326; 1:100) y anti-CD49f (eBioscience, 46-0495; 1:200). Las células se analizaron usando el software BD LSR Fortessa y BD FACS Diva (Becton Dickinson).

La apoptosis se detectó usando un kit I de detección de apoptosis con anexina V FITC (BD Bioscience) según las instrucciones del fabricante. En resumen, las células se recolectaron con una solución de tripsina-EDTA al 0,05 %, se lavaron y se diluyeron a 1×10^6 células por ml en 1 x tampón de unión. La tinción se realizó durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad añadiendo 5 μ l de solución de anticuerpo acoplado a FITC y 5 μ l de PI a las células en 100 μ l de tampón de unión. Posteriormente, se añadieron 400 μ l de tampón de unión y las células se analizaron utilizando un software BD LSR Fortessa y BD FACS Diva (Becton Dickinson). Se contaron un total de 1×10^5 células. El análisis se realizó con el software FlowJo v6.

Ejemplo 3: Ensayo de tumorigenidad *in vivo* en ratones NOD/SCID portadores de xenoinjertos de BC ortotópicos

Todos los experimentos y la manipulación de ratones se realizaron según la normativa alemana sobre bienestar animal y fueron aprobados por las autoridades locales (protocolo animal G13/114).

Las hembras NOD/SCID (4-5 semanas de edad) se anestesiaron con un inhalador de isoflurano. Una pequeña incisión sagital (no superior a 1,0 cm) en el abdomen rasurado y esterilizado permitió acceder a las glándulas mamarias n.º 4 de ambos lados. Las células tumorales se mezclaron con 1×10^6 fibroblastos irradiados (fibroblastos de prepucio humano recién nacido (NuFF), p11, Global Stem, GSC-3002) cada uno, y se suspendieron en una mezcla 1:1 de Matrigel:medio de MSC. El volumen de cada trasplante fue de 40 μ l por glándula, que contenía un número definido de BCSC y 1×10^6 fibroblastos. El trasplante se inyectó en la almohadilla adiposa mamaria de la glándula n.º 4 de ambos lados del animal con una jeringa de 1 ml con una aguja fina. Cada trasplante se localizó distalmente al ganglio linfático de la glándula. Las incisiones quirúrgicas se cerraron suturando con un hilo 5/0 (Ethicon, Z995). Los animales fueron supervisados dos veces por semana para determinar su peso y el crecimiento del tumor, que se determinó mediante un calibrador. Los volúmenes tumorales se calcularon usando la fórmula: $4/3 \times \pi \times r^3$.

El tamaño del tumor se supervisó usando mediciones de ultrasonido recopiladas usando un sistema de ultrasonido de alta resolución para animales pequeños (Vevo3100) y un transductor (MXSSOD) con 40 MHz (VisualSonics, Toronto, Canadá). Para el modelado del tumor en 3D, el transductor se movió automáticamente a lo largo del tumor con un tamaño de paso de 0,076 mm. Las imágenes representativas mostraron diferencias cualitativas entre los tumores, tal como se visualizaron con Vevo LAB v. 1.7.1 al principio y al final del tratamiento.

Para el tratamiento *in vivo*, el KDM4(i) se disolvió inmediatamente antes del tratamiento en un vehículo que consistía en un 50 % de polietilenglicol (SIGMA) y un 50 % de DPBS (pH = 9, Gibco) con tratamiento de ultrasonidos (Bioruptor de Diagenode) hasta que se formó una solución transparente. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño palpable de 2 mm de diámetro, los ratones se asignaron al azar a diferentes grupos ($n = 8$, cada grupo). El inhibidor se administró

diariamente a ratones NOD/SCID por sonda oral a 10 mg/kg. Los animales de control solo recibieron el vehículo. Los animales fueron supervisados dos veces por semana para determinar el peso corporal y el crecimiento tumoral, que se determinó mediante un calibrador.

5 En cuanto a la inmunohistoquímica, los especímenes tisulares se fijaron inmediatamente con formalina (10 %). Tras la fijación con formalina y la incrustación en parafina, se cortaron secciones de 2 μ m de grosor y se montaron sobre cubreobjetos. Todos los cubreobjetos se almacenaron durante dos días a 58 °C en una cámara de secado, posteriormente se desparafinaron con xileno y se hidrataron con etanol. El tejido tumoral humano y el injertado correspondiente se tiñeron usando anticuerpos listos para usar contra la proteína receptora de estrógenos (monoclonal de conejo anti-receptor α de estrógenos humano, clon EP1, código IR084), proteína receptora de progesterona (monoclonal de ratón anti-receptor de progesterona humano, clon pGR 636, código IR068), HER2 (policlonal de conejo oncoproteína anti-C-erbB-2 humano, código A0485), Ki-67 (monoclonal de ratón anti-antígeno Ki-67 humano, clon MIB-1, código IR626), vimentina (monoclonal de ratón anti-vimentina, clon V9, código IR630), E-cadherina (monoclonal de ratón anti-E-cadherina humano, clon NCH-38, código IR059) y contra citoqueratina 8/18 (monoclonal de conejo anti-citoqueratina humano 8/18, clon EP17/EP30, código IR094). Para la detección de peroxidasa a base de rábano picante (dependiente del hospedador) se utilizó el reactivo bloqueante de peroxidasa Flex de ENVISION® (DAKO, SM801), Flex + Conejo de ENVISION® (LINKER) (DAKO, K8019) o Flex + Ratón de ENVISION® (LINKER) (DAKO, K8021) y Flex/HRP de ENVISION® (DAKO, SM802). La contratinación se realizó con hemalumbre antes de añadir un cubreobjetos. Como control positivo interno, se usó la glándula mamaria fisiológica derivada del paciente para ER, PR, 20 Ki-67 (tinción nuclear), citoqueratina 8/18 y E-cadherina (tinción citoplasmática membranosa). La capa mioepitelial que rodea la glándula mamaria se usó como control interno para la Vimentina. Para HER2, se llevaron especímenes de tejido de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo (Puntuación 3 según Ref²⁰) para cada sesión de tinción de HER2 como control positivo externo. El cáncer de mama triple negativo se definió como cáncer de mama RE, RP y HER2 negativos (puntuación < 2). Goldhirsch y col, Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen Int'l Expert Consensus on Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013, 24 Ann. Oncol. 2206 (2013).

25

30 El ARN se aisló como se describe. Metzger y col., Assembly of methylated KDM1A and CHD1 drives androgen receptor-dependent transcription and translocation, 23 Nat. Str'l Mol. Biol. 132 (2016). La RT-PCR cuantitativa que usa el kit de PCR SYBR Green de Abgene (Invitrogen) se utilizó según el protocolo del proveedor, utilizando HPRT para la normalización y secuencias cebadoras para HPRT. Id. Los cebadores para VCAN, PRR5, ATF4, EGR1, FST, EGFR, RUNX1 se muestran en la siguiente tabla:

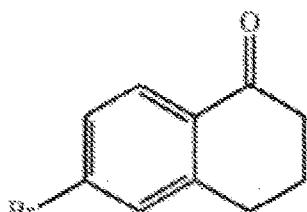
35	Cebador	Secuencias de cebadores	Id. de sec. n.º:
40	VCAN	5'-ACTGTGGATGGGGTTGTGTT-3'	N.º: 1
		5'-CTGCGTCACACTGCTCAAAT-3'	N.º: 2
45	PRR5	5'-CGGGACAAGATTCGCTTCTA-3'	N.º: 3
		5'-AGCGCATCCTCTAGCTTCAC-3'	N.º: 4
50	ATF4	5'-CCAACAAACAGCAAGGAGGGAT-3'	N.º: 5
		5'-GTGTCATCCAACGTGGTCAG-3'	N.º: 6
55	EGR1	5'-TGACCGCAGAGTCTTTCCCT-3'	N.º: 7
		5'-CACAAGGTGTTGCCACTGTT-3'	N.º: 8
60	FST	5'-GGAAAACCTACCGCAATGAA-3'	N.º: 9
		5'-GAGCTGCCTGGACAGAAAAC-3'	N.º: 10
65	EGFR	5'-CCAACCAAGCTCTCTTGAGG-3'	N.º: 11
		5'-GCTTCGGAGATGTTGCTTC-3	N.º: 12
60	RUNX1	5'-CACTGCCTTAAACCTCAGC-3'	N.º: 13
		5'-ACAGAAGGAGAGGAATGGA-3'	N.º: 14

Antes de la recolección para la secuenciación del ARN (RNA-seq), las células BCSC1 se cultivaron durante 18 h en ausencia o presencia de 5×10^{-10} M de KDM4(i), como se indica. Las muestras de ARN se secuenciaron mediante el protocolo Illumina convencional para crear archivos de secuencia sin procesar (archivos .fastq) en la instalación central de secuenciación del DKFZ. Estas lecturas se alinearon con la construcción hg19 del genoma humano utilizando la versión 2 de TopHat. Las lecturas alineadas se contaron con el software Homer (analyze RNA) y los DEG se identificaron utilizando EdgeR y DESeq versión 1.8.3. Los datos se depositan ante GSE.

Ejemplo 4: Síntesis química de derivados de pirimidina sustituidos

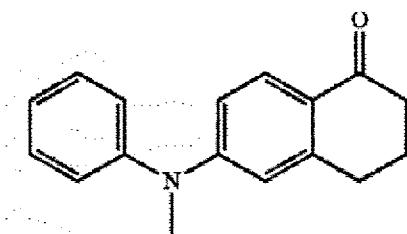
A menos que se observe de cualquier otra manera, los reactivos y los solventes se usaron tal como se recibieron de los suministradores comerciales. Los solventes anhidros y la cristalería secada al horno se usaron para las transformaciones de síntesis sensibles a la humedad y/o al oxígeno. Los rendimientos no se optimizaron. Los tiempos de reacción son aproximados y no se optimizaron. La cromatografía en columna y la cromatografía en capa fina (TLC) se realizaron sobre gel de sílice a menos que se observe de cualquier otra manera. Los espectros se dan en ppm (δ) y las constantes de acoplamiento J se informan en hercios. Para los espectros de protones se usó el pico del disolvente como el pico de referencia. La síntesis química del ácido 3-([6-[metil(fenil)amino]-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il]metil)amino)piridin-4-carboxílico (Compuesto I) se puede llevar a cabo, por ejemplo, basándose en el método descrito en la patente estadounidense N.º 9.447.046. En resumen, el Compuesto I se puede preparar según las siguientes preparaciones:

15 Preparación 1a: 6-bromo-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-ona



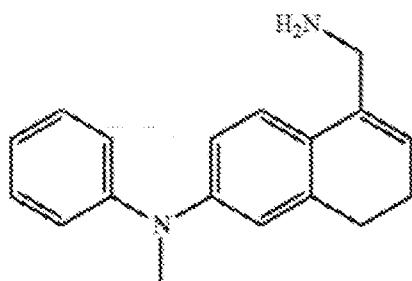
20 Una solución de NaNO_2 (2,35 g, 34 mmol) en agua (10 ml) se añadió gota a gota a la solución de 6-amino-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-ona (5,0 g, 31 mmol) en HBr al 25 % (16 ml) a 0 °C. Despues, la suspensión se transfirió a una mezcla agitada de CuBr (8,9 g, 62 mmol) en HBr al 48 % (30 ml) a 0 °C. La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La mezcla se extrajo con EtOAc , se secó (Na_2SO_4) y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc/Hex de 0 % -60 %) para dar 5,6 g (80 %) del compuesto del título como un aceite amarillo claro. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 2,10-2,16 (2H, m), 2,64 (2H, t, J =6,4 Hz), 2,94 (2H, t, J =6,0 Hz), 7,42 (1H, s), 7,44 (1H, s), 7,87 (1H, d, J =8,9 Hz). $[\text{M}+\text{H}]$ calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{BrO}$: 225, 227; encontrado: 225, 227.

25 35 Preparación 1b: 6-[metil(fenil)amino]-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-ona



40 Se añadió a una solución de 6-bromo-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-ona (2,0 g, 8,9 mmol) en tolueno (20 ml), N-metilanilina (960 mg, 8,9 mmol), Cs_2CO_3 (4,4 g, 13,4 mmol), BINAP (310 mg, 0,5 mmol) y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (110 mg, 0,5 mmol). La mezcla se agitó durante la noche a 100 °C bajo N_2 . La mezcla se filtró y se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc/Hex de 30 % -80 %) para dar 1,52 g (68 %) del compuesto del título en forma de un aceite marrón claro. $[\text{M}+\text{H}]$ calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}$: 252; encontrado: 252.

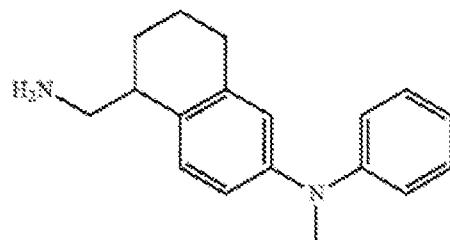
50 55 Preparación 1c: clorhidrato de 5-(aminometil)-N-metil-N-fenil-7,8-dihidronaftalen-2-amina



5 A una solución de la Preparación 1b (1,52 g, 6,0 mmol) y ZnI₂ (150 mg) en tolueno (20 ml) se añadió TMSCN (1,2 g, 12 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se calentó a 60 °C durante 2 h, después se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con la adición de THF (20 ml). Se añadió lentamente una solución de LAH (5 ml, 2,4 M en THF, 12 mmol) a temperatura ambiente y la solución se agitó durante 0,5 h. La reacción se detuvo con la adición de EtOAc (10 ml) y después agua (1 ml) y NaOH acuoso 1 M (1 ml). La solución se secó (Na₂SO₄) y se concentró para dar 1,52 g (89 %) del 1-(aminometil)-6-[metil(fenil)amino]-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-ol en bruto como un sólido blanco.

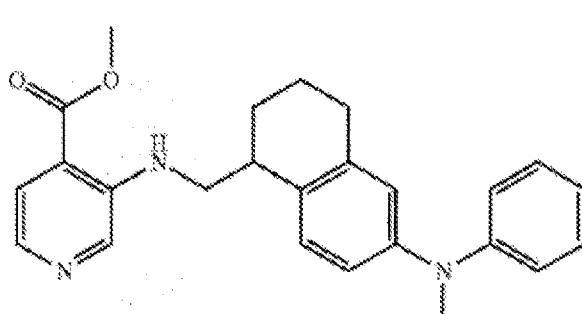
10 En una solución de este producto intermedio (1,52 g, 5,4 mmol) en metanol (20 ml) se burbujeó gas de HCl seco durante 2 min, mientras que se enfrió para mantener la temperatura rxn a ≤30 °C. Después, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El metanol se evaporó a presión reducida para dar 1,4 g (98 %) del compuesto del título como la sal de HCl. [M+H] calculado para C₁₈H₂₀N₂: 265; encontrado 265.

15 Preparación 1d: 5-(aminometil)-N-metil-N-fenil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-amina



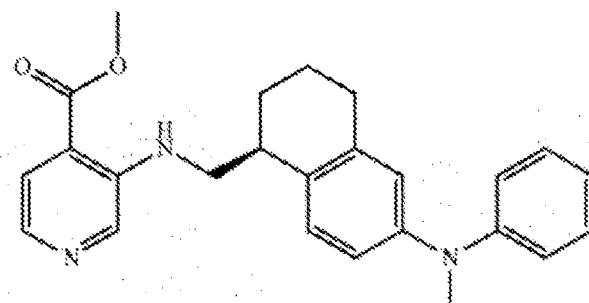
20 25 A una solución de la Preparación 1c (1,4 g, 5,3 mmol) en MeOH (30 ml) y HCl conc. (tres gotas) se añadió Pd/C al 10 % (200 mg) a temperatura ambiente bajo N₂. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 16 h bajo hidrógeno a 50 psi. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, se ajustó a pH de aproximadamente 8-9 con Na₂CO₃ sat., se secó (Na₂SO₄) y se concentró para dar 830 mg (59 %) del compuesto del título como un aceite naranja. [M+H] calculado para C₁₈H₂₂N₂: 267; encontrado: 267.

30 Preparación 1e: 3-[{(6-[metil(fenil)amino]-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il] metil}amino]piridin-4-carboxilato de metilo



35 40 45 50 A una solución de la Preparación 1d (500 mg, 1,88 mmol) en DMA (12 ml) se añadió 3-fluoroisonicotinato de metilo (300 mg, 1,93 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 170 °C durante 1 h en un microondas, después se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. Los orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc/Hex de 20 %-80 %) para dar 200 mg (26 %) del compuesto del título como un aceite amarillo. [M+H] calculado para C₂₅H₂₇N₃O₂: 402; encontrado: 402.

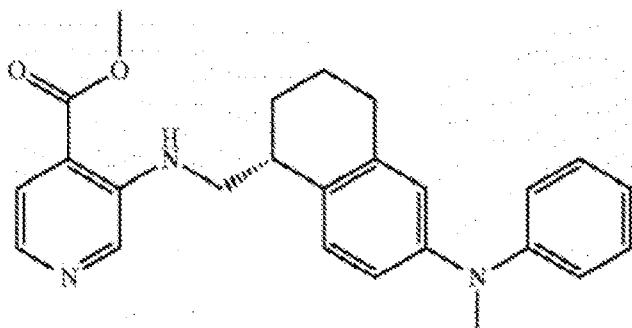
55 Preparación 1f: 3-{{[(1 S)-6-[metil(fenil)amino]-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il]metil}amino}piridin-4-carboxilato de metilo



60 65 y

Preparación 2f: 3-({[(1R)-6-[metil(fenil)amino]-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il]metil}amino)piridin-4-carboxilato de metilo

5



10

15

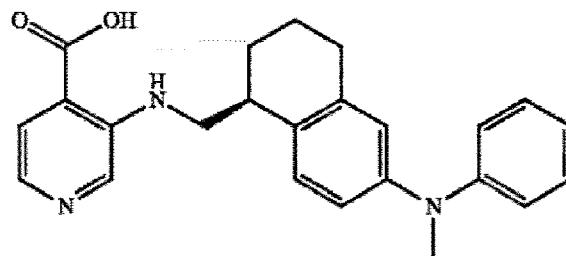
La Preparación 1e (200 mg) se separó mediante HPLC quirial (Columna: Chiralcel IA, 250 mm*4,6 mm 5 μ m; Fase móvil: Hex:EtOH = 85:15; F: 1.0 ml/min; W: 230 nm; T = 30 °C) para dar 95 mg (47 %) de la Preparación 1f (6,54 min) y 92 mg (46 %) de la Preparación 2f (7,91 min), cada uno en forma de un aceite amarillo.

20

Preparación 1 g: Ácido 3-({[(1S)-6-[metil(fenil)amino]-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il] metil}amino)piridin-4-carboxílico

25

30



A una solución de la Preparación 1f (95 mg, 0,24 mmol) en THF (6 ml) y H₂O (2 ml) se añadió LiOH.H₂O (31 mg, 0,72 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se concentró para eliminar el THF y el residuo se diluyó con agua y se acidificó a pH aproximadamente 3-4 con una solución acuosa de HCl 1,0 N. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con EtOAc/éter. El sólido se secó al vacío para dar 52 mg (56 %) del compuesto del título como un sólido amarillo. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1,64-1,67 (1H, m), 1,77-1,84 (3H, m), 2,65-2,68 (2H, d, J=5,6 Hz), 3,04-3,07 (1H, m), 3,21 (3H, s), 3,41-3,47 (1H, m), 3,56-3,60 (1H, m), 6,78-6,92 (5H, m), 7,21-7,25 (3H, m), 7,55 (1H, d, J=5,2 Hz), 7,82 (1H, d, J=5,2 Hz), 8,36 (1H, s). [M+H]⁺ Calculado para C₂₄H₂₅N₃O₂: 388; encontrado: 388.

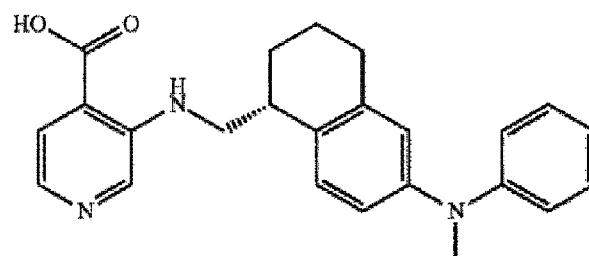
40

Preparación 2 g: Ácido 3-({[(1R)-6-[metil(fenil)amino]-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il] metil}amino)piridin-4-carboxílico (Compuesto I)

45

50

55



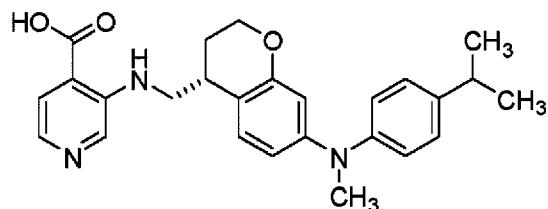
El compuesto del título se preparó con un rendimiento de 53 % a partir de la Preparación 2f según el procedimiento de la Preparación 1g. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1,64-1,68 (1H, m), 1,77-1,84 (3H, m), 2,65-2,68 (2H, d, J=5,6 Hz), 3,04-3,07 (1H, m), 3,21 (3H, s), 3,41-3,47 (1H, m), 3,56-3,60 (1H, m), 6,78-6,92 (5H, m), 7,21-7,25 (3H, m), 7,56 (1H, d, J=4,8 Hz), 7,82 (1H, d, J=5,2 Hz), 8,36 (1H, s). [M+H]⁺ calculado para C₂₄H₂₅N₃O₂: 388; encontrado: 388.

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es ácido 3-[(*(4R*)-7-[metil[4-propan-2-il]fenil]amino]-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-4-il]metil]amino)piridin-4-carboxílico, representado por la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

para su uso en un método de tratamiento de un cáncer asociado a la actividad lisina desmetilasa 4 (un cáncer asociado a KDM4),

comprendiendo el método administrar a un paciente que lo necesita una composición farmacéutica que comprende el compuesto o la sal y un excipiente farmacéuticamente aceptable,

en donde el cáncer asociado a KDM4 se selecciona de cáncer de mama triple negativo, cáncer de colon, linfoma de Burkitt o leucemia mieloide aguda.

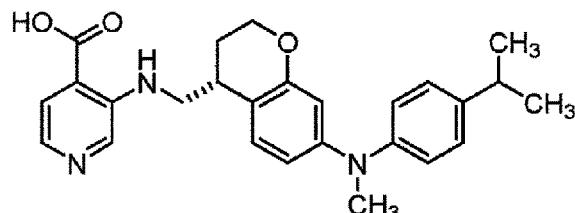
2. El compuesto o la sal para el uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer asociado a KDM4 es cáncer de mama triple negativo.

3. El compuesto o la sal para el uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer asociado a KDM4 es cáncer de colon.

4. El compuesto o la sal para el uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer asociado a KDM4 es linfoma de Burkitt.

5. El compuesto o la sal para el uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer asociado a KDM4 es leucemia mieloide aguda.

6. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde el compuesto es ácido 3-[(*(4R*)-7-[metil[4-propan-2-il]fenil]amino]-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-4-il]metil]amino)piridin-4-carboxílico, representado por la estructura:



7. El compuesto para el uso de la reivindicación 6, en donde el cáncer asociado a KDM4 es cáncer de mama triple negativo.

8. El compuesto para el uso de la reivindicación 6, en donde el cáncer asociado a KDM4 es cáncer de colon.

9. El compuesto para el uso de la reivindicación 6, en donde el cáncer asociado a KDM4 es linfoma de Burkitt.

10. El compuesto para el uso de la reivindicación 6, en donde el cáncer asociado a KDM4 es leucemia mieloide aguda.

Figura 1A

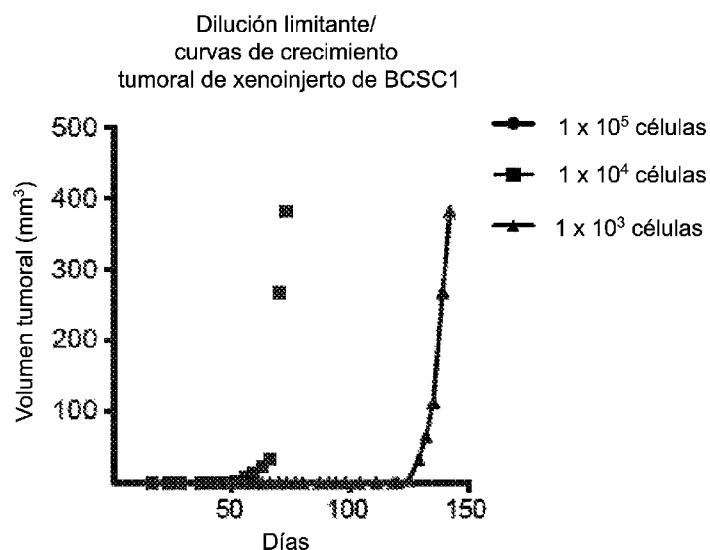


Figura 1B

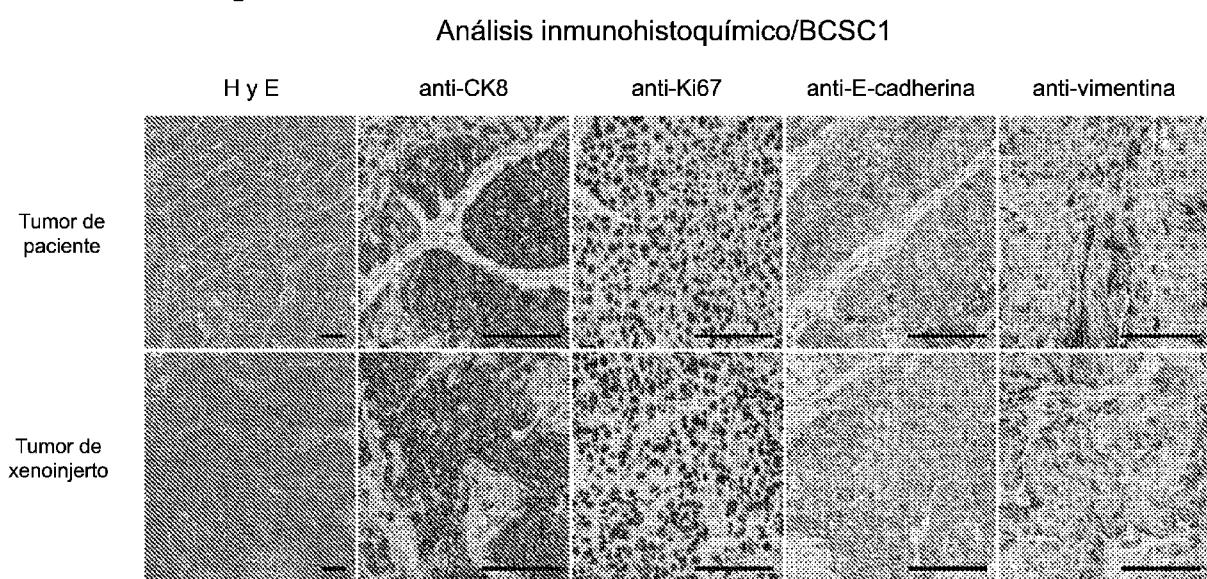


Figura 1C
Análisis inmunohistoquímico/BCSC1

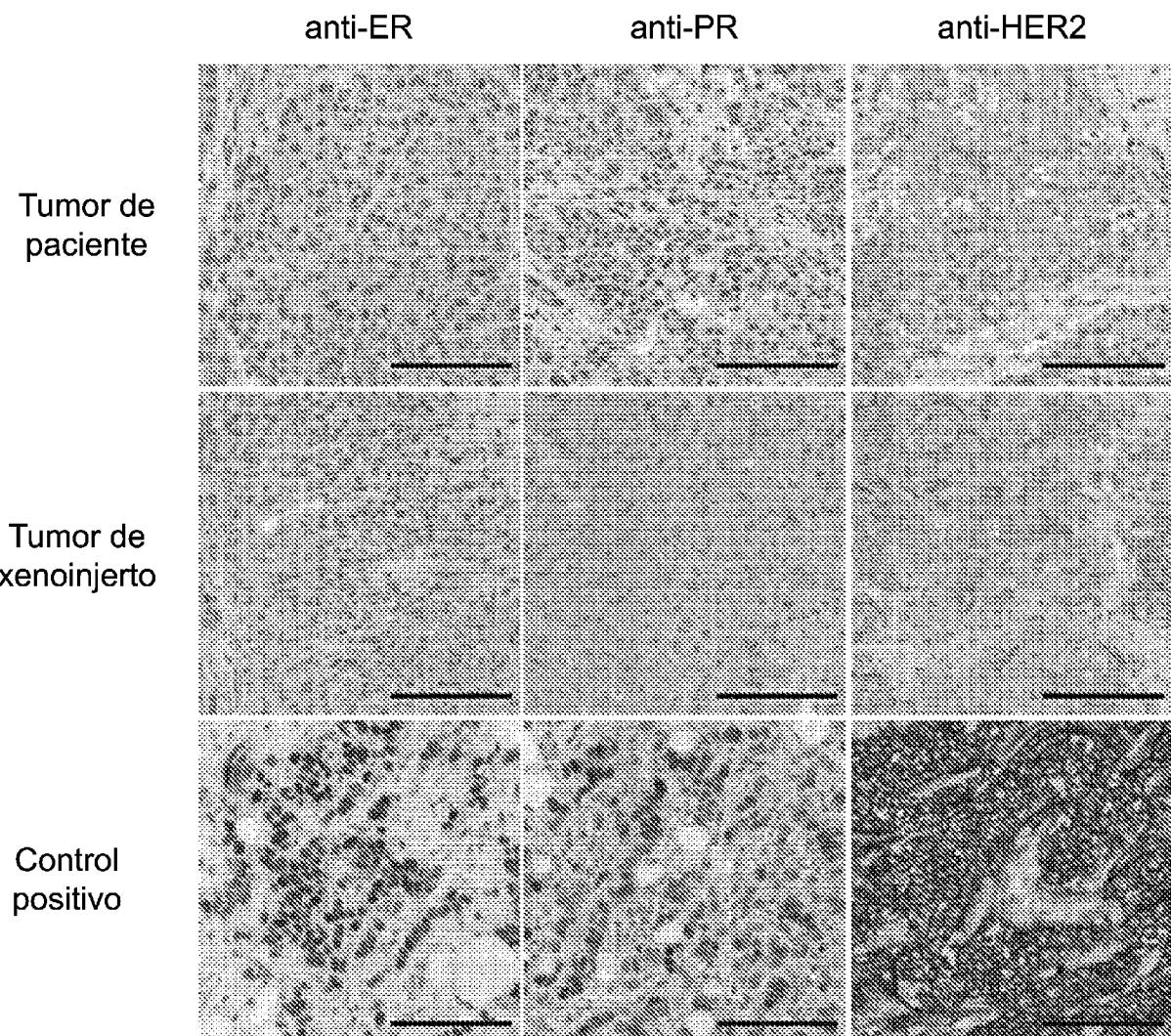
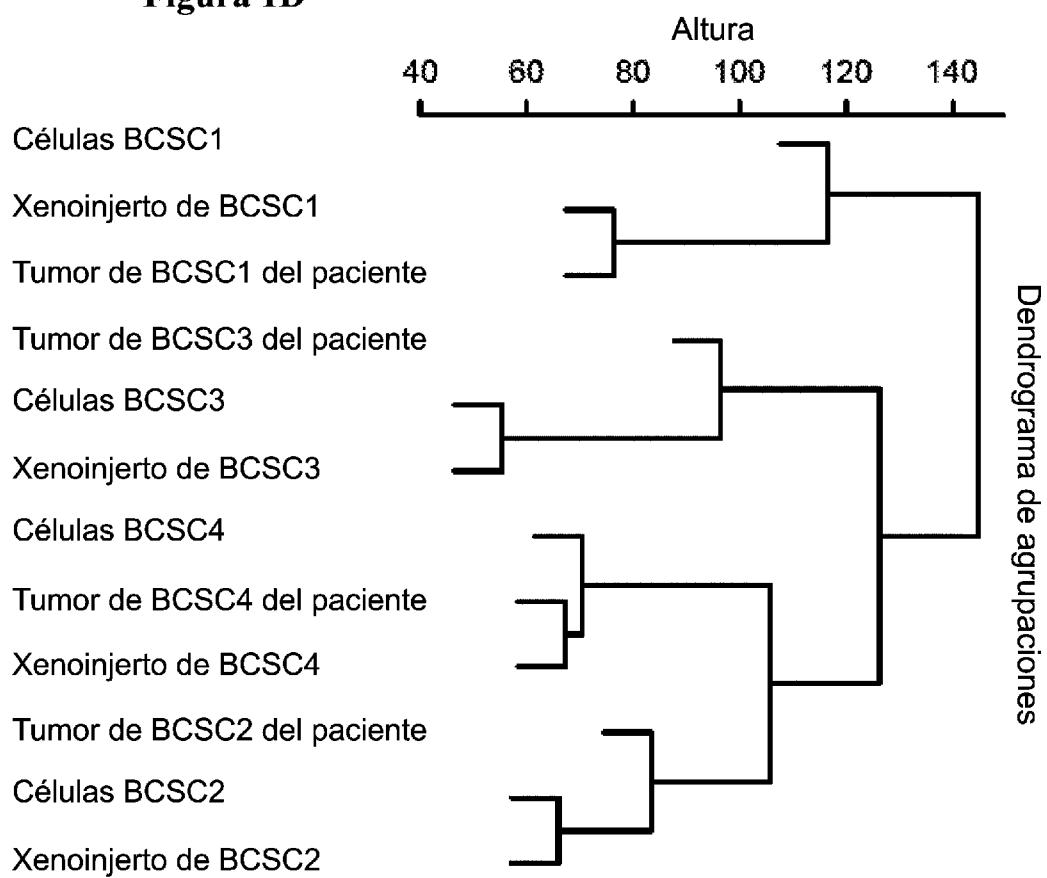
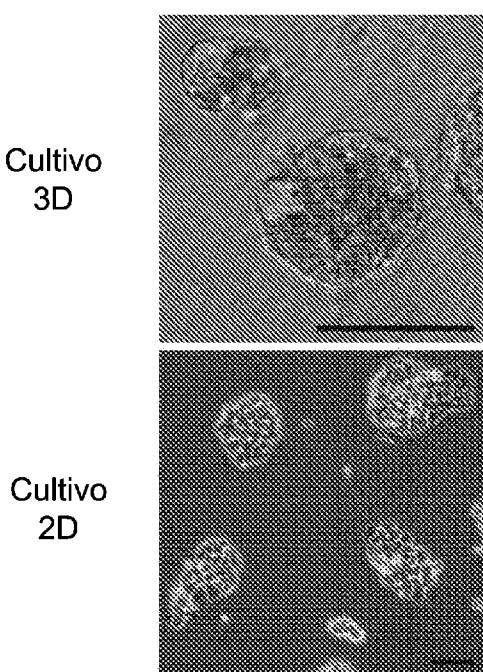


Figura 1D**Figura 1E****Figura 1F**

Capacidad de formación de esferas 3D/células BCSC1

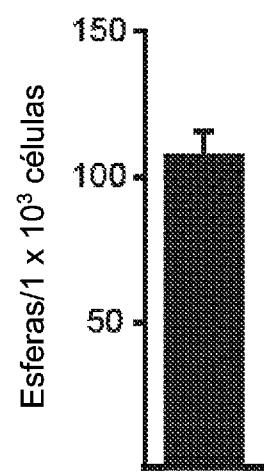


Figura 1G

Perfil de marcadores de CSC/células BCSC1

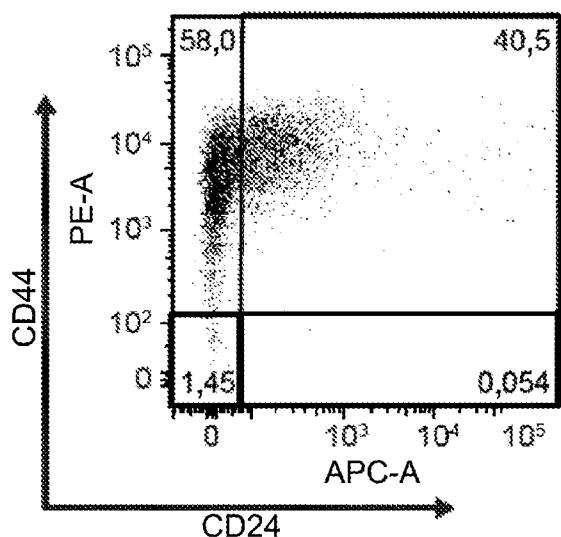


Figura 1H

Perfil de marcadores de CSC/células BCSC1

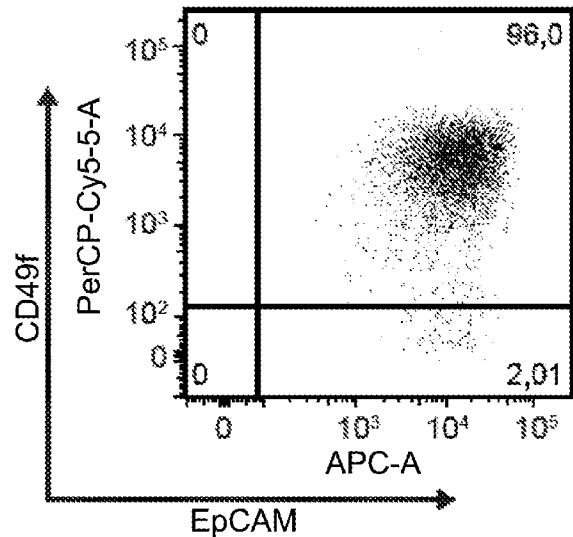


Figura 2A

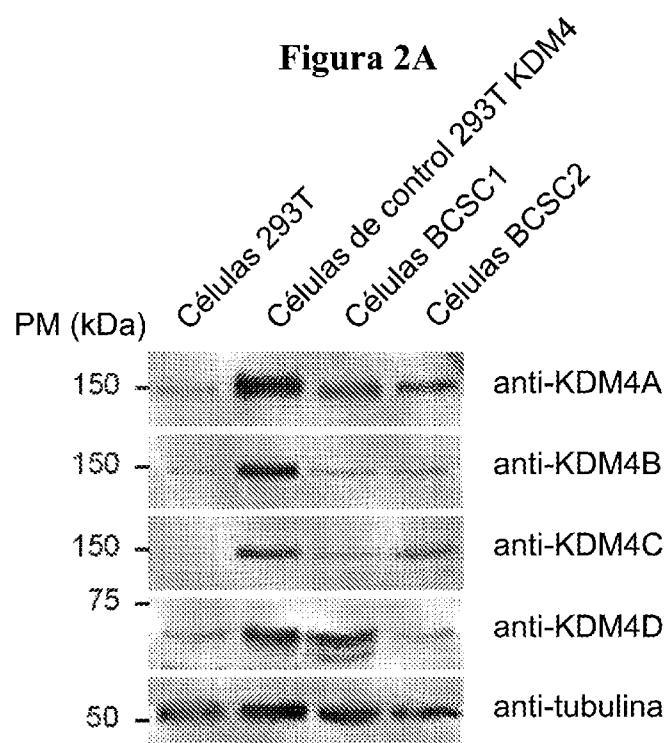
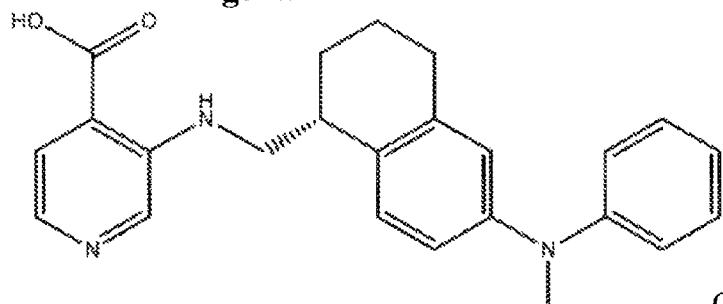


Figura 2B

Compuesto I

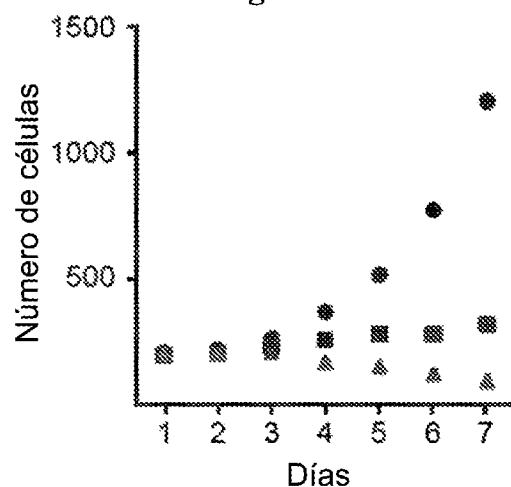
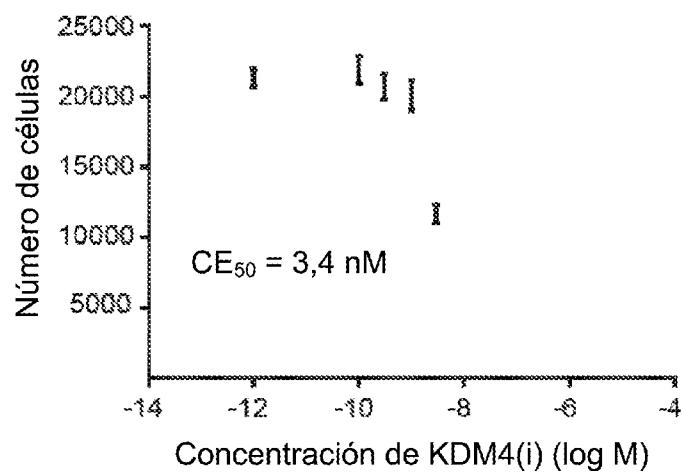
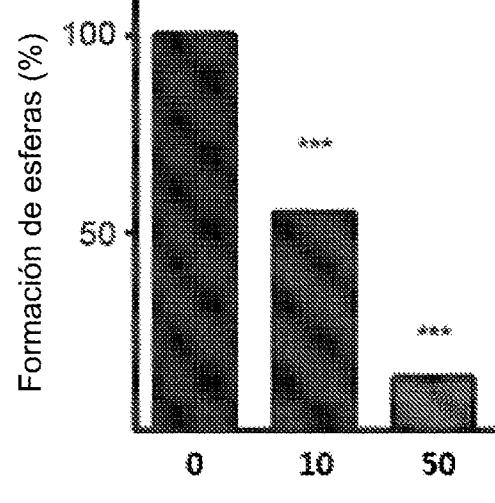
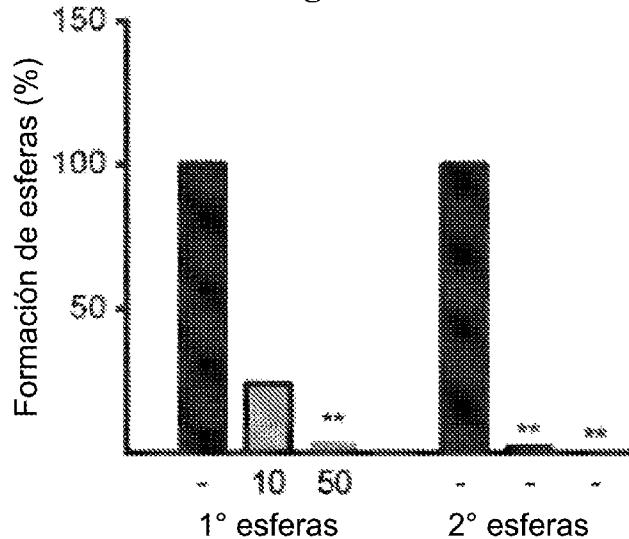
Figura 2C**Figura 2D****Figura 2E****Figura 2F**

Figura 3A

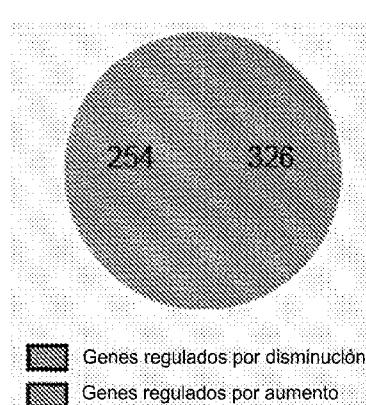


Figura 3B

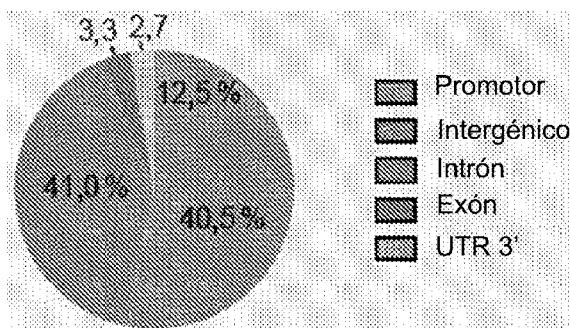


Figura 3C

Genes con KDM4A presente en el promotor (16792 genes) Transcriptoma +vs- KDM4(i) (580 genes, $p < 1e-5$)

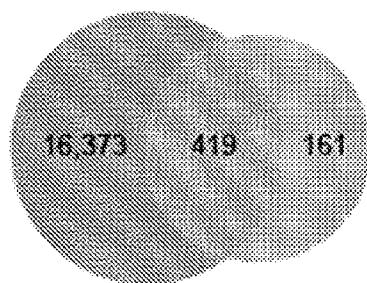


Figura 3D

Vía de señalización del receptor EGF (ErbB1)
 Interacciones entre la familia de las integrinas y la superficie celular
 Vía de señalización de TRAIL
 Vía de la esfingosina 1-fosfato (S1P)
 Interacciones entre la integrina beta-1 y la superficie celular
 Eventos de tráfico de Arf6
 Vía de la insulina

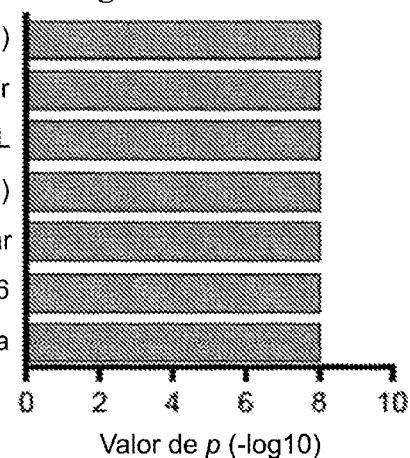


Figura 3E
- + KDM4(i)

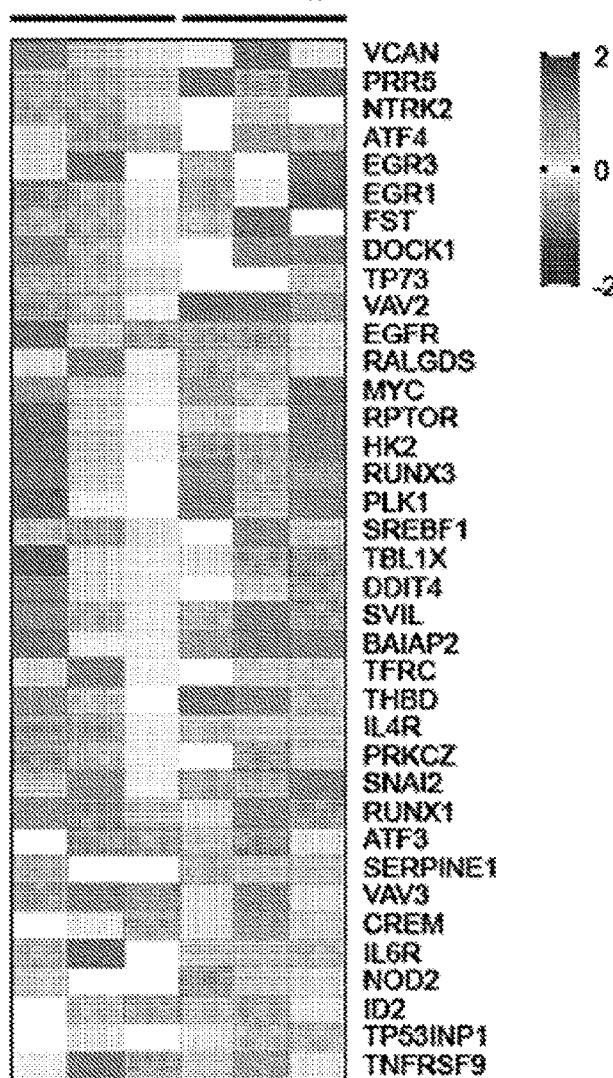


Figura 3G
Células BCSC1

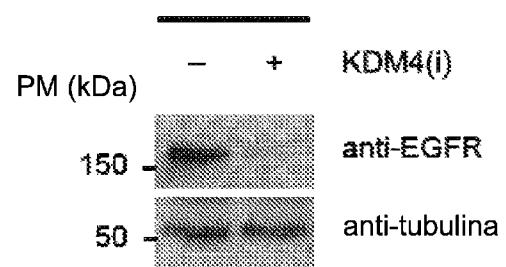


Figura 3H
Células BCSC1

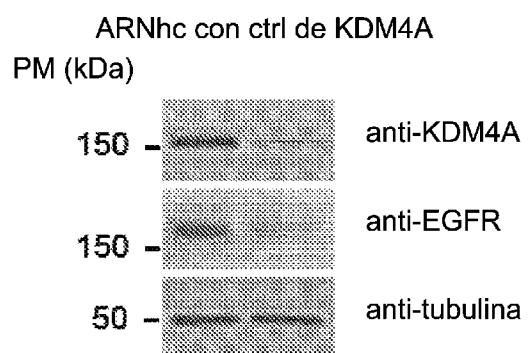


Figura 3F

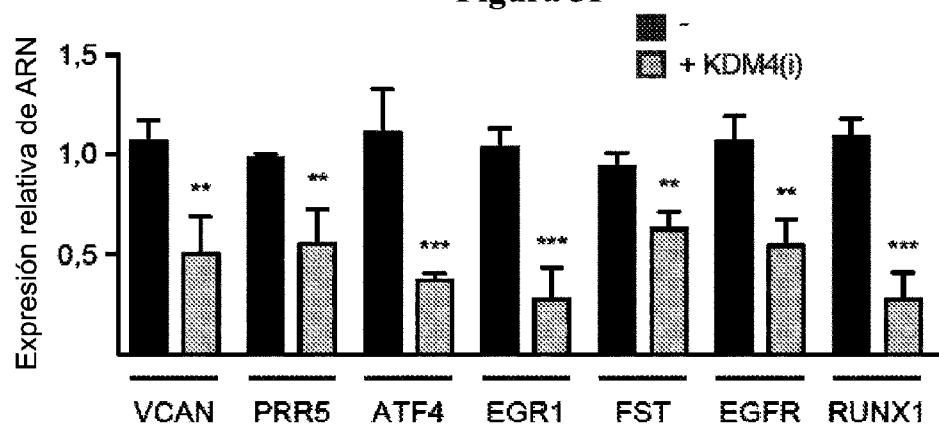
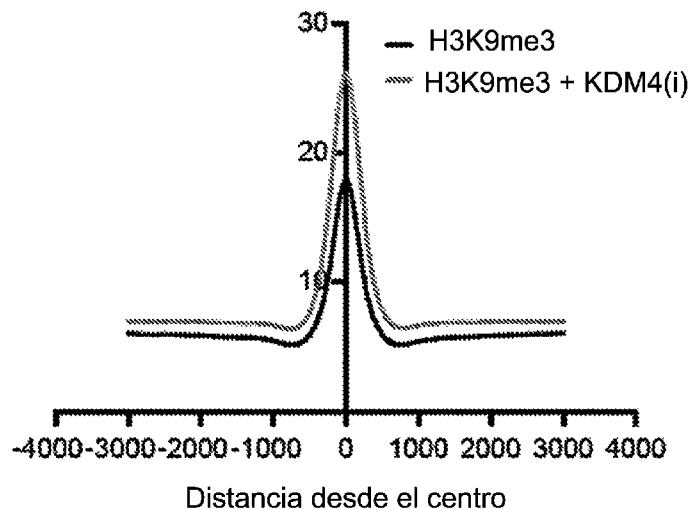


Figura 3I

Etiqueta de ChIP-sep normalizada sobre picos

**Figura 3J**

Células BCSC1/pistas de ChIP-Seq

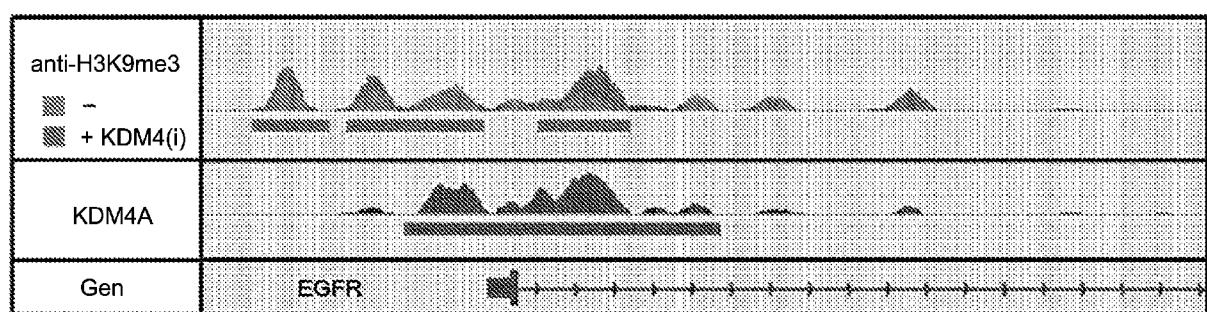


Figura 4A
Xenoinjertos
tumorales/BCSC1

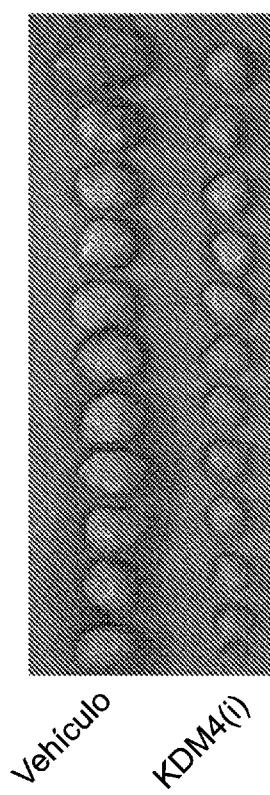


Figura 4B
Xenoinjertos de BCSC1

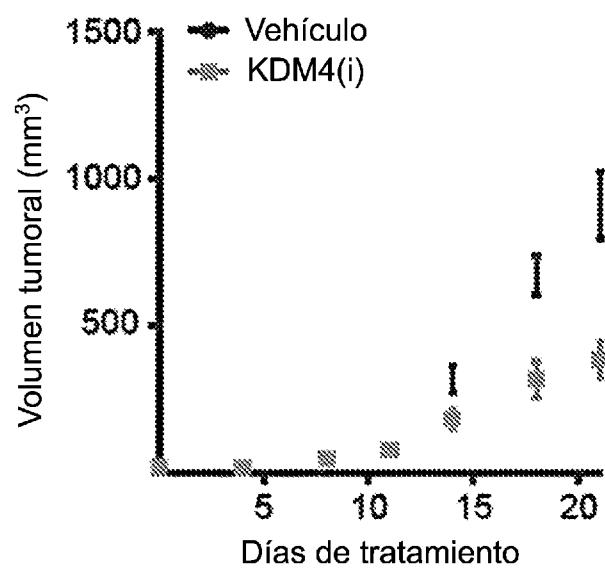


Figura 4C
Pesos tumorales

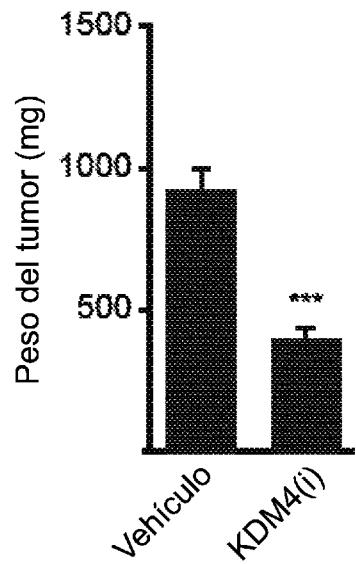
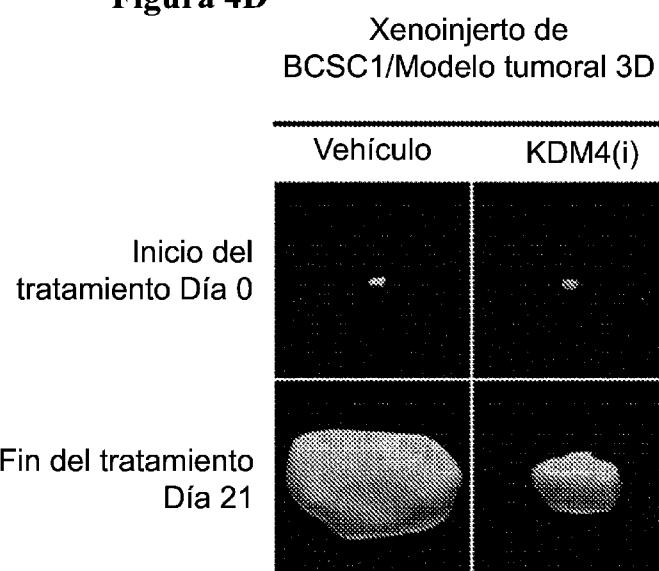
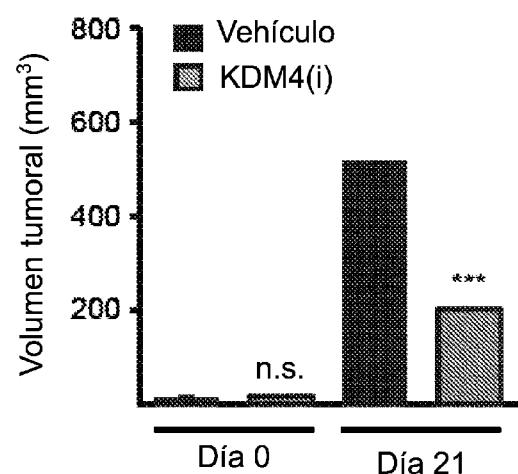


Figura 4D**Figura 4E**

Volumen tumoral BCSC1

**Figura 4F**

Análisis de expresión/xenoinjerto de BCSC1

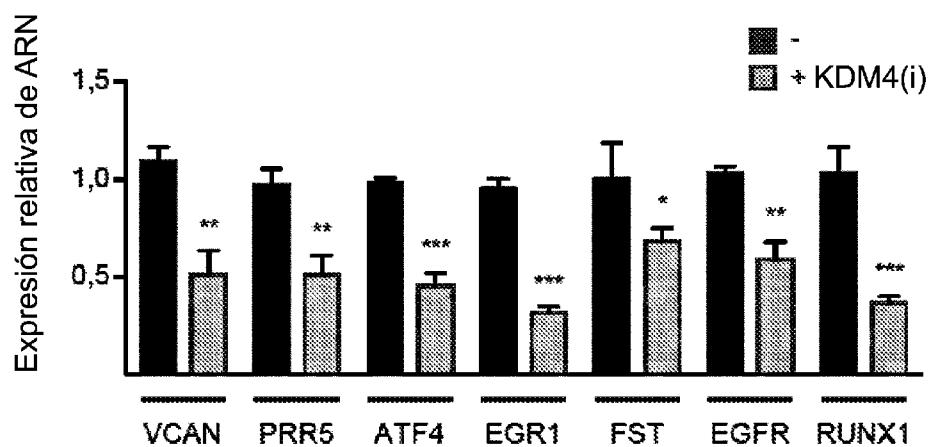


Figura 5A

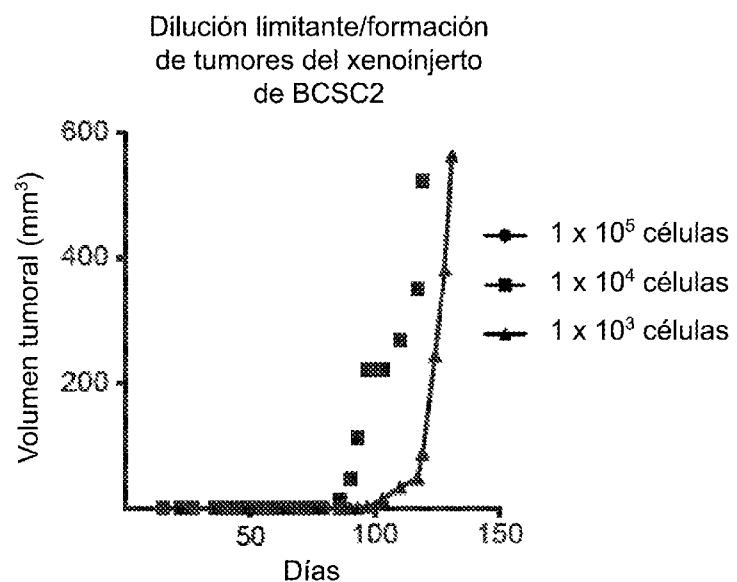


Figura 5B

Análisis inmunohistoquímico/BCSC2

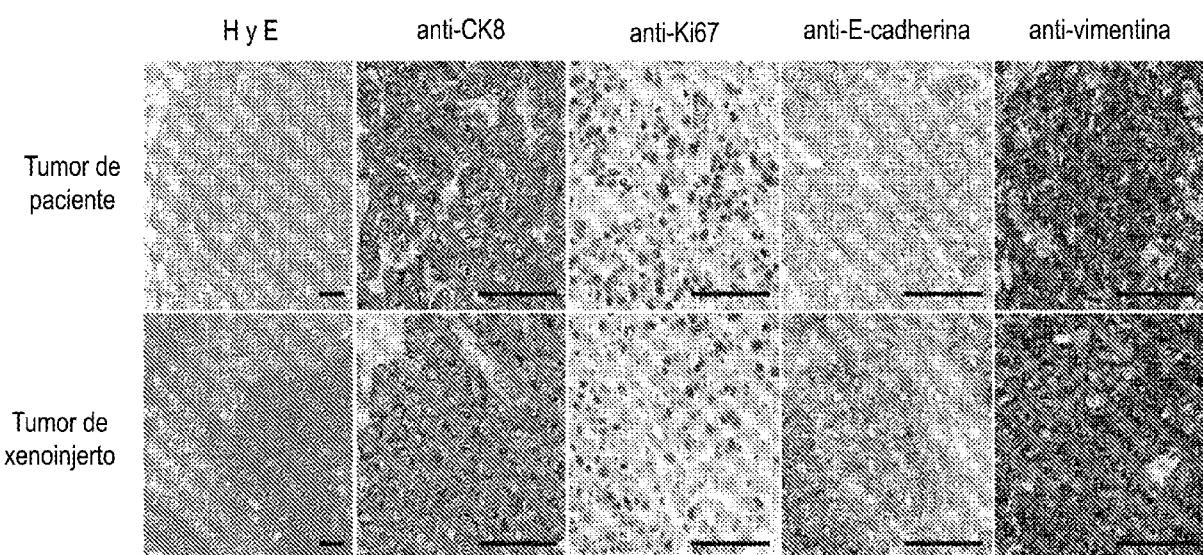


Figura 5C

Análisis inmunohistoquímico/BCSC2

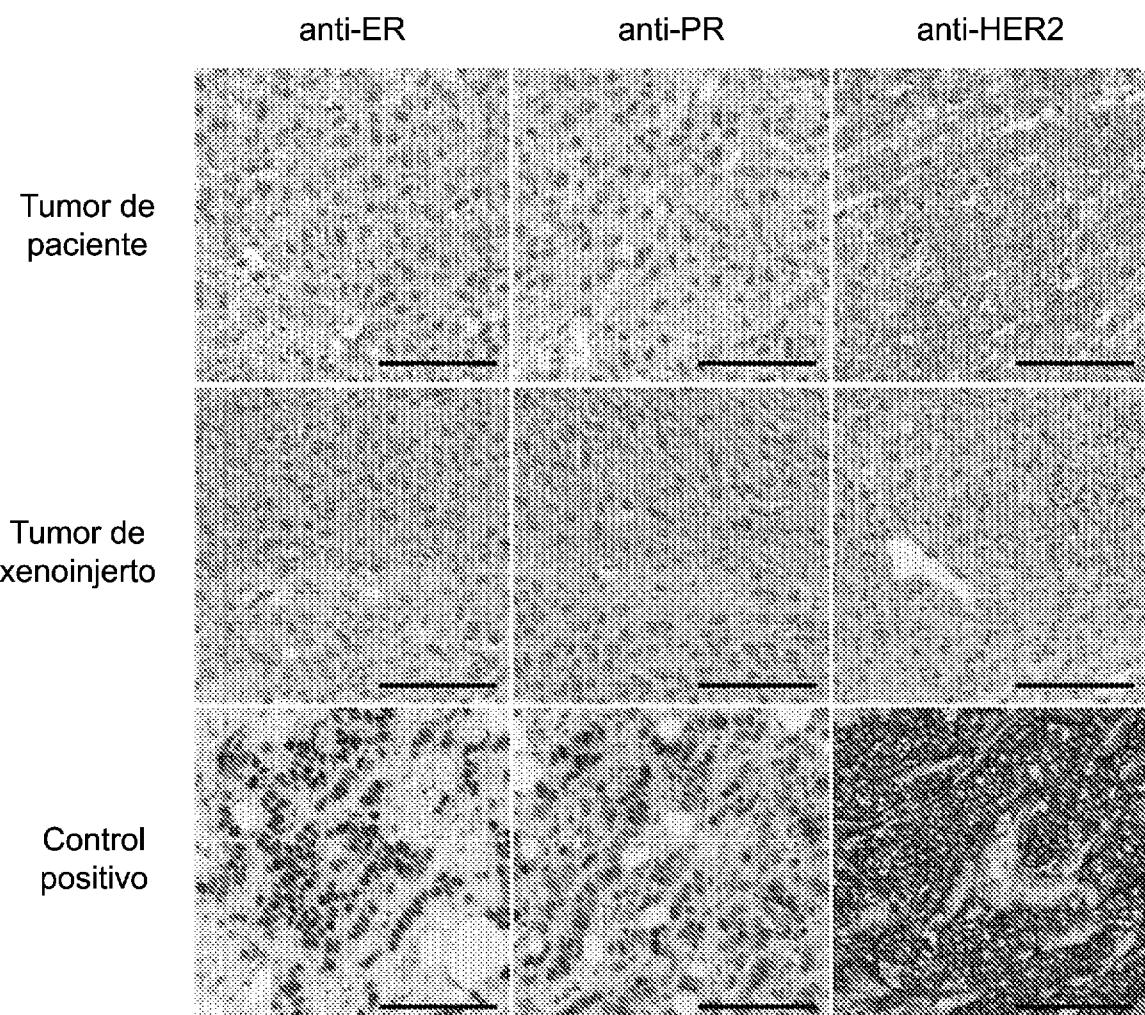


Figura 5D

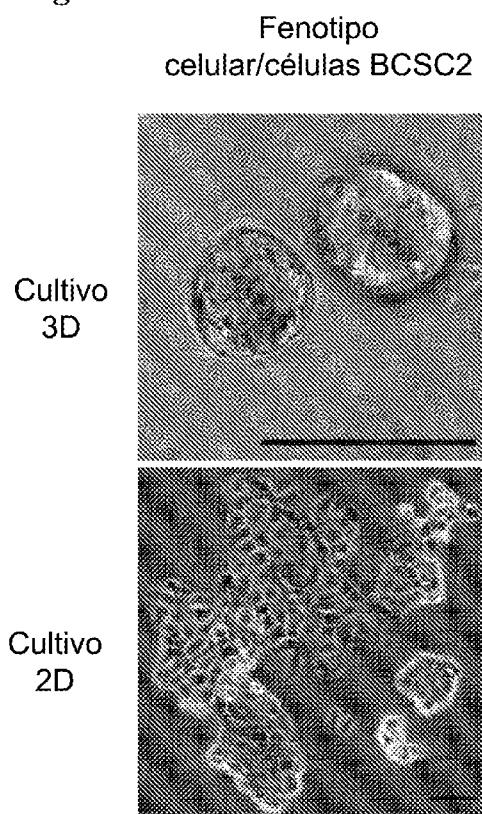


Figura 5E

Capacidad de formación de esferas 3D/células BCSC2

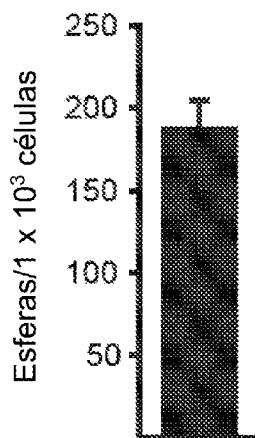


Figura 5F

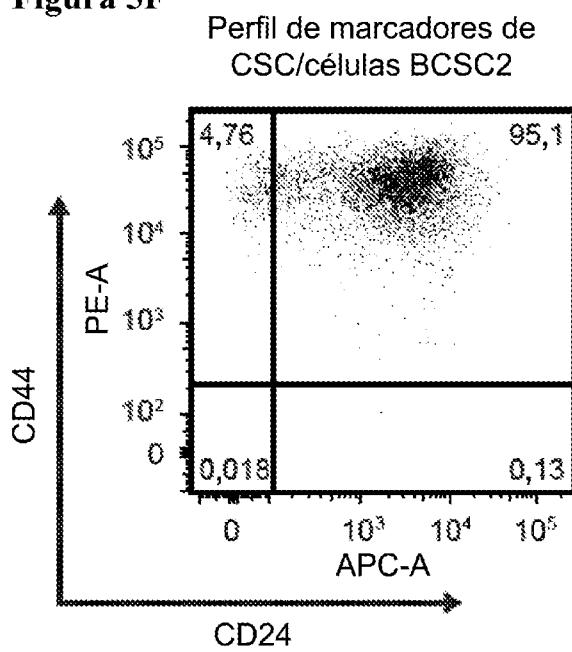


Figura 5G

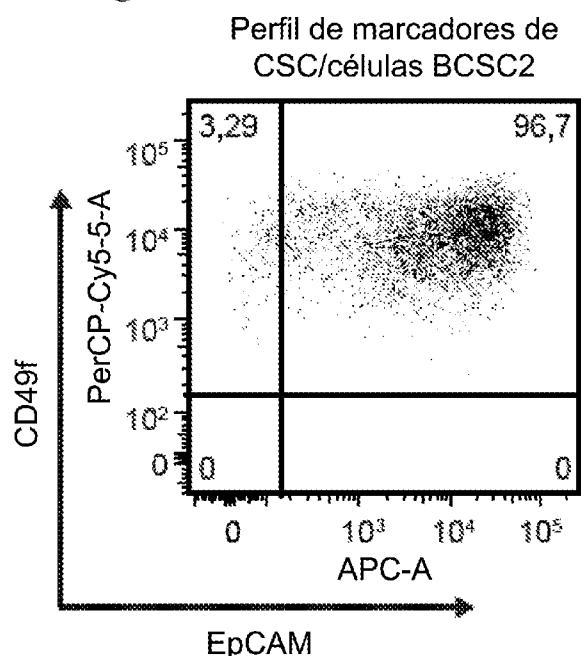


Figura 6A

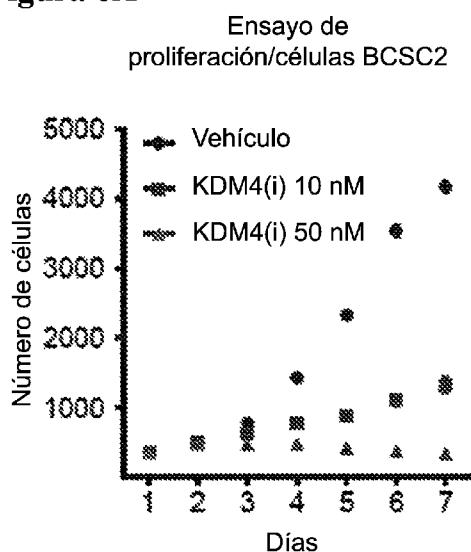


Figura 6B

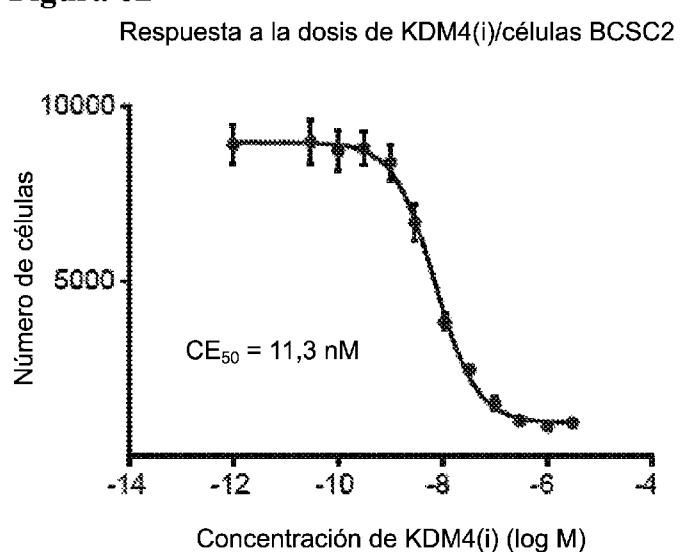


Figura 6C

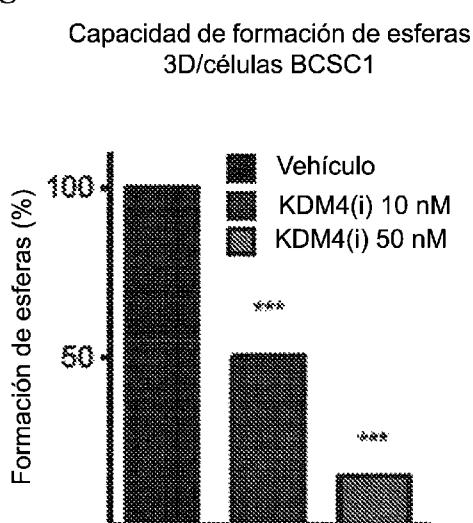


Figura 6D

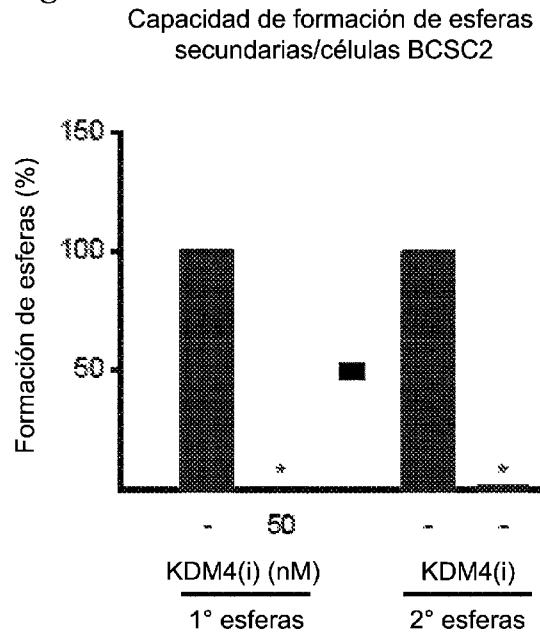


Figura 6E

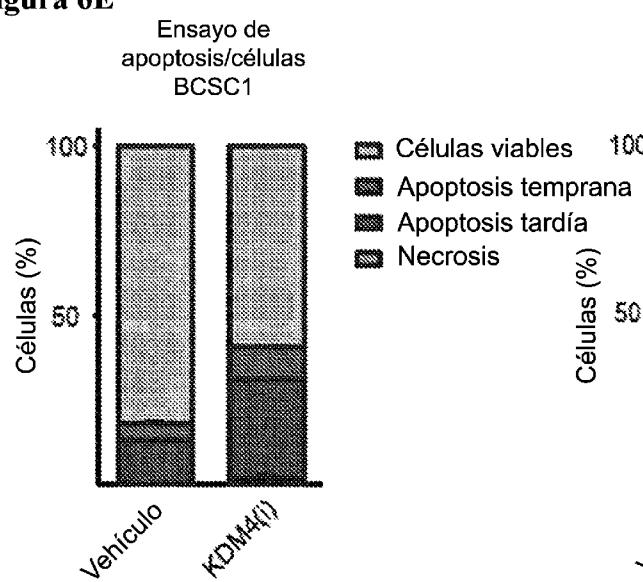


Figura 6F

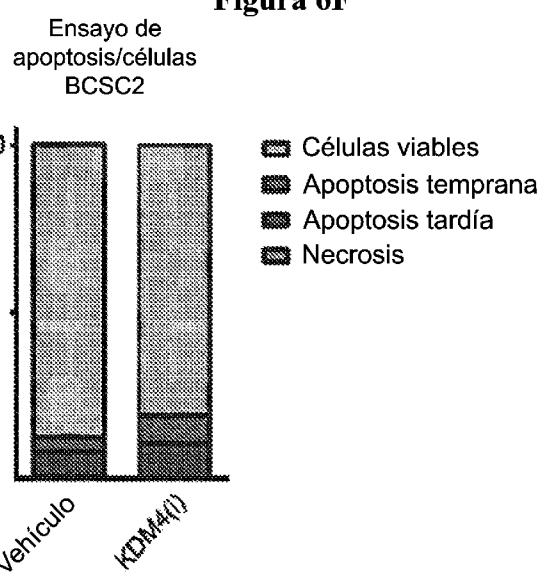


Figura 7A

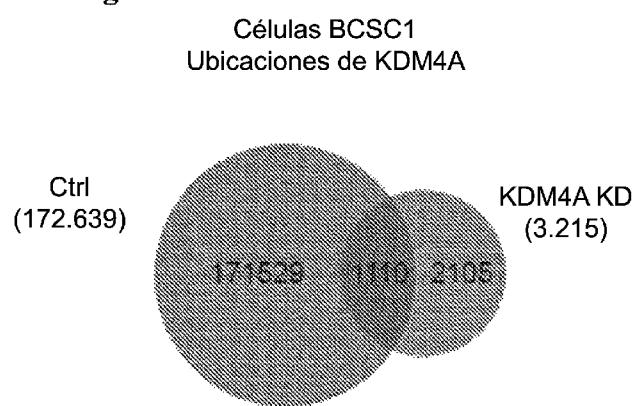


Figura 7B

Ensayo de proliferación/
células BCSC1

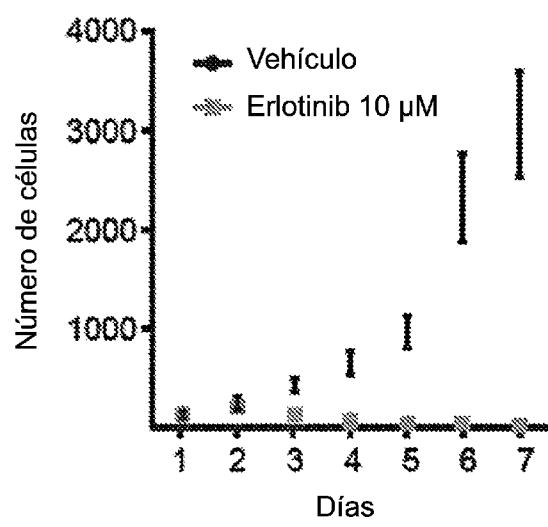


Figura 7C

Ensayo de proliferación/
células BCSC2

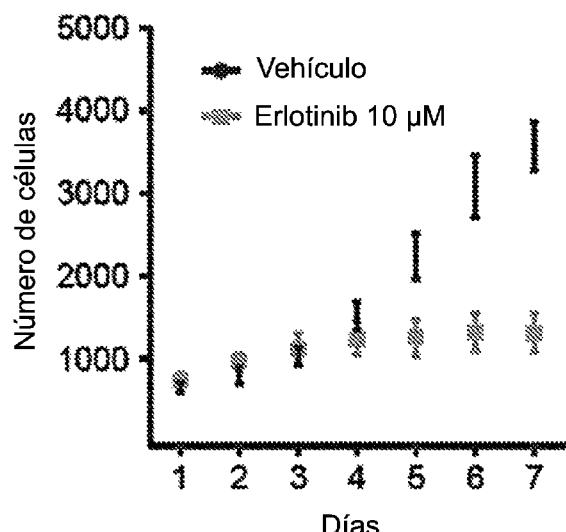


Figura 7D

Respuesta a la dosis de células BCSC1

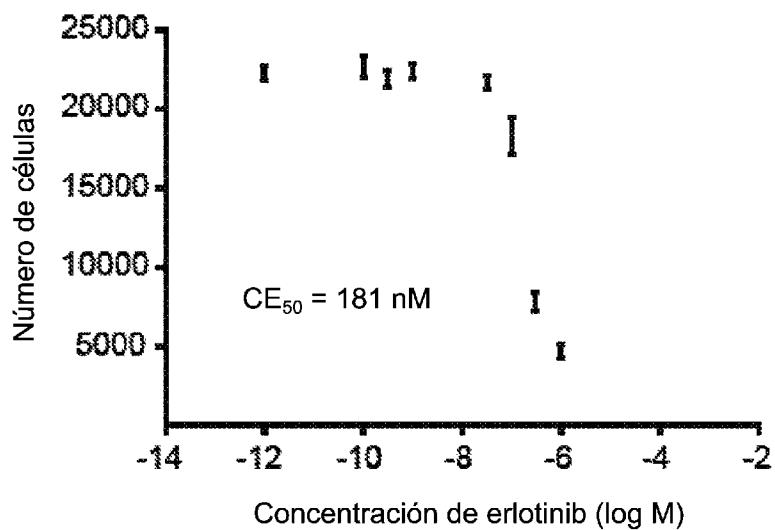
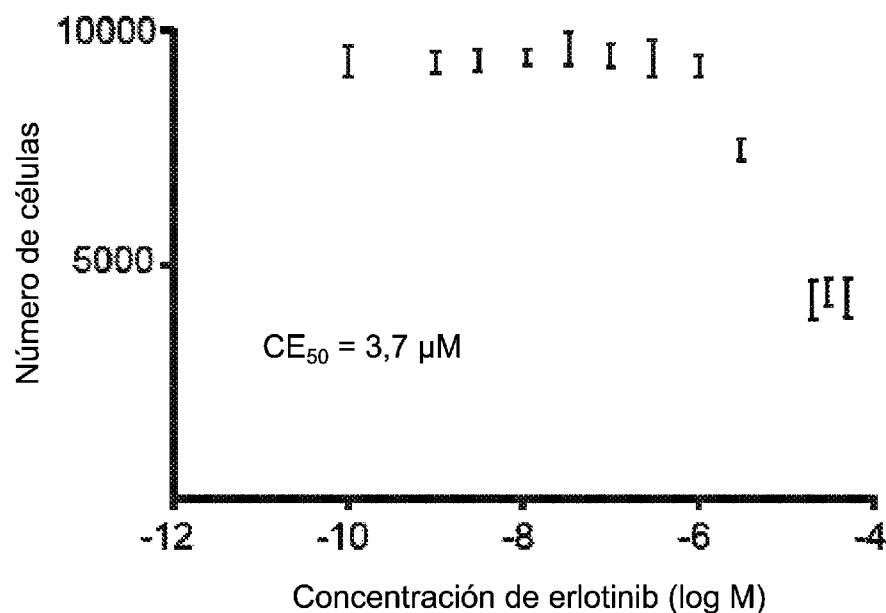
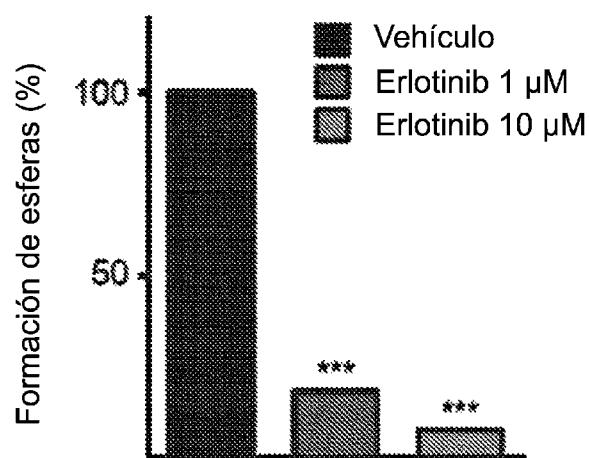


Figura 7E
Respuesta a la dosis de células BCSC2

**Figura 7F**

Capacidad de formación de esferas
3D/células BCSC1

**Figura 7F**

Capacidad de formación de esferas
3D/células BCSC2

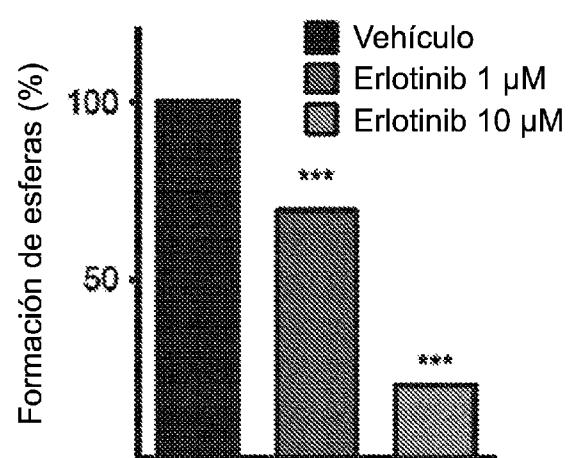


Figura 7H

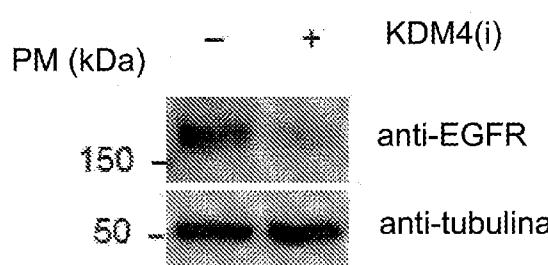


Figura 7I

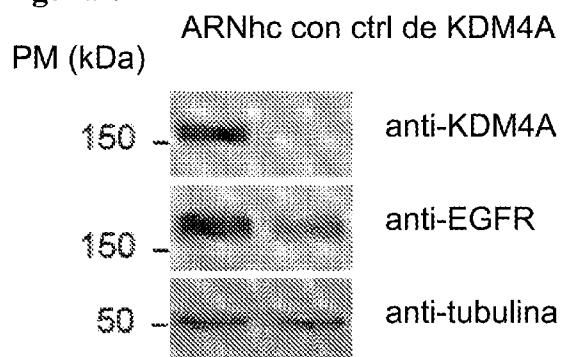


Figura 7J

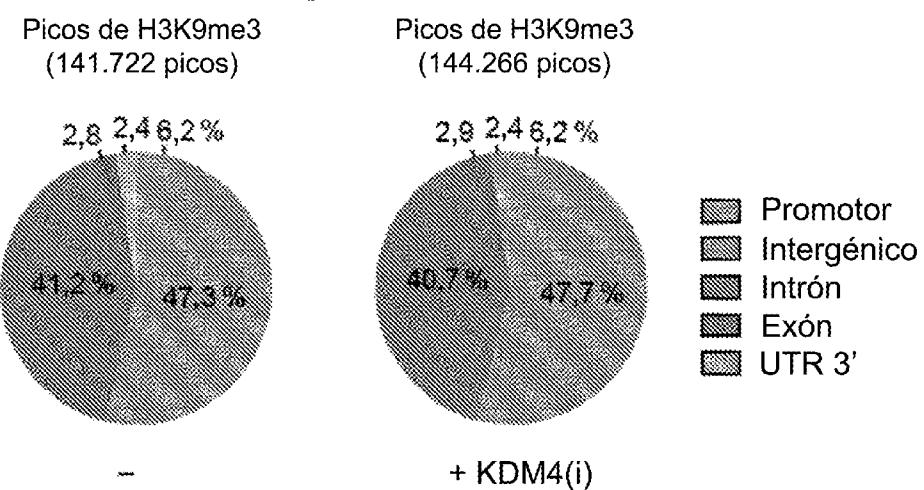


Figura 7K

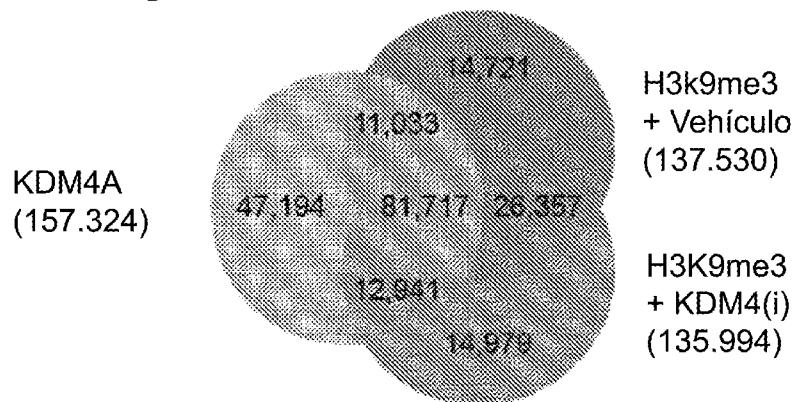
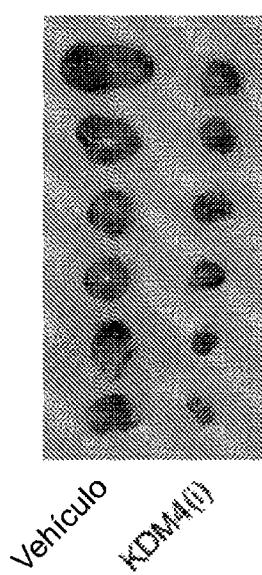
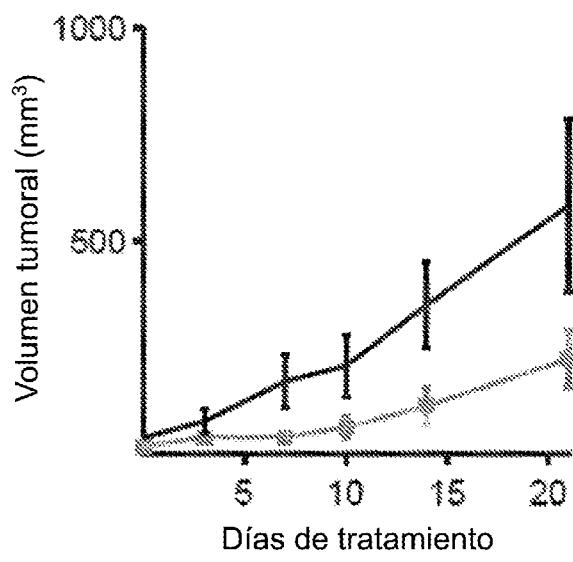


Figura 8A

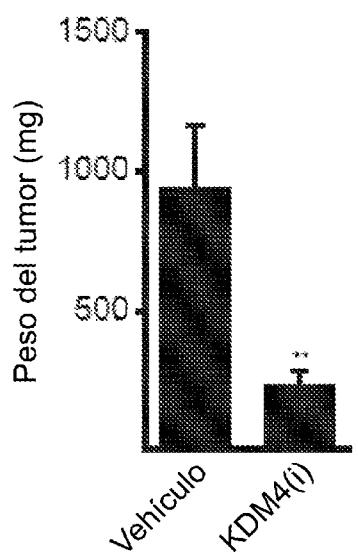
Xenoinjertos
tumorales/BCSC2

**Figura 8B**

Xenoinjertos de BCSC2

**Figura 8C**

Pesos tumorales

**Figura 8D**

Modelo tumoral
3D/xenoinjertos de BCSC2

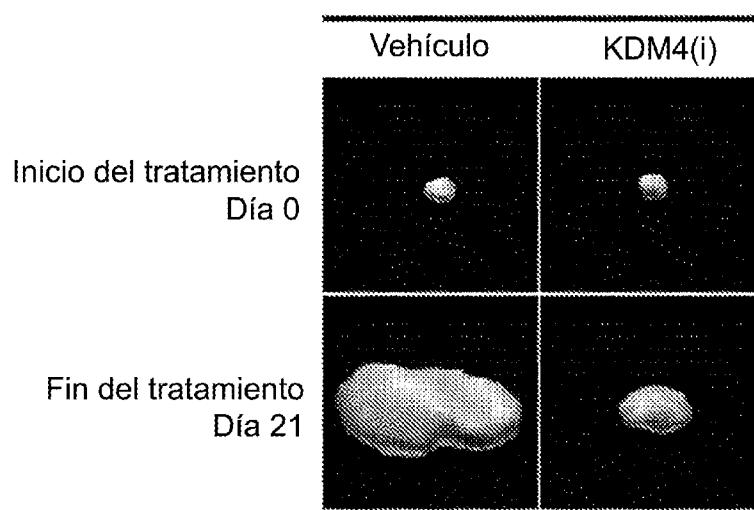


Figura 8E

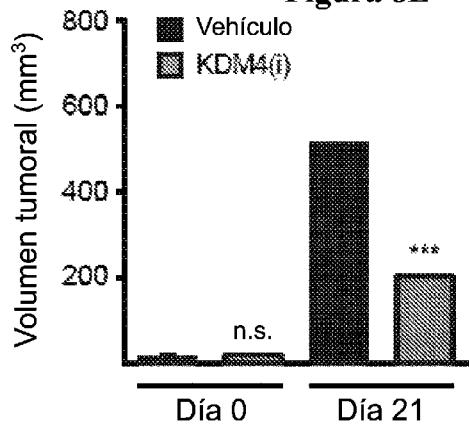


Figura 8F

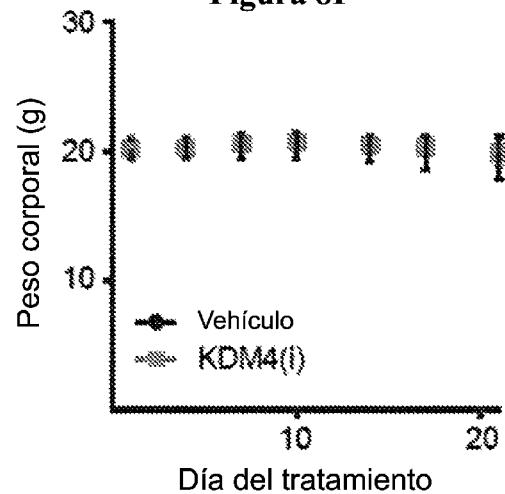


Figura 8G

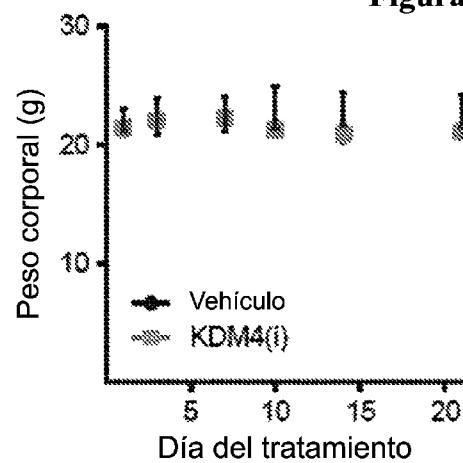


Figura 9

