

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 068 440**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/495** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2022 PCT/EP2022/070350**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2023 WO23001891**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2022 E 22751728 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2026 EP 4373514**

54 Título: **Conexina 43 para su uso en el tratamiento de tumores positivos para proteína de retinoblastoma**

30 Prioridad:

**20.07.2021 EP 21382657**

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

**29.05.2026**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN PROFESOR NOVOA SANTOS (90,00%)**

**Avda. Xubias de Arriba, 84**

**15006 A Coruña / ES, ES y**

**SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (10,00%)**

72 Inventor/es:

**MAYÁN SANTOS, MARÍA DOLORES;**

**CARPINTERO FERNÁNDEZ, PAULA;**

**GARCÍA YUSTE, ALEJANDRO;**

**ACEA NEBRIL, BENIGNO y**

**FONSECA CAPDEVILA, EDUARDO**

74 Agente/Representante:

**MARTÍNEZ, Miguel Ángel**

Observaciones:

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

ES 3 068 440 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**

Conexina 43 para su uso en el tratamiento de tumores positivos para proteína de retinoblastoma

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo médico. Particularmente, la presente invención se refiere a la conexina 43 (Cx43) para su uso en el tratamiento de un tipo de cáncer caracterizado por la presencia de un gen de retinoblastoma (RB) funcional, o por la presencia de RB funcional y también por hiperactividad de CDK4 y CDK6, preferiblemente en combinación con un inhibidor de CDK4/6.

**Estado de la técnica**

Una característica clave de la mayoría de las células cancerosas es la desregulación de las proteínas de punto de control del ciclo celular, tales como las cinasas dependientes de ciclina (CDK) CDK4 y CDK6, lo que conduce a una proliferación celular descontrolada. Las cinasas del ciclo celular CDK4 y CDK6 fosforilan a los miembros de la familia de proteínas de retinoblastoma (pRb) y regulan la progresión a través de G1 y la entrada a la fase de síntesis de ADN (S). CDK4 y CDK6 se unen a las ciclinas de tipo D D1, D2, y D3, lo que conduce a la activación de CDK4/6 y la fosforilación de pRb. La fosforilación de pRb dependiente de CDK provoca su inactivación y permite la inducción transcripcional de genes necesarios para la progresión del ciclo celular. La mayoría de los tipos de tumores muestran una regulación por incremento funcional de estas cinasas a través de la sobreexpresión (tal como la amplificación o translocación) de ciclinas de tipo D o muestran una inactivación de los inhibidores de la ciclina D-CDK4/6, que incluyen las proteínas INK4, compuestas por 4 inhibidores: p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, y p19INK4d. Estos inhibidores inactivan específicamente CDK4 y CDK6 al inducir cambios estructurales que evitan la unión y activación por ciclinas de tipo D. p16INK4a, p15INK4b, y p18INK4c se encuentran inactivados en muchos tumores por delección, mutación, o regulación de la actividad del promotor de gen.

Se han informado cambios moleculares en los niveles de CDK en diversos tipos de cáncer, lo que las convierte en un objetivo potencial atractivo para nuevos tratamientos. Los inhibidores de CDK, en particular los inhibidores de CDK4/6 (tales como abemaciclib, palbociclib y ribociclib), inducen la detención del ciclo celular y la posterior senescencia celular en líneas celulares de cáncer humano. Mecánicamente, los inhibidores de CDK4/6 inhiben la actividad de CDK4/6 y la fosforilación de Rb, estabilizando el complejo inhibidor Rb-E2F e inhibiendo por tanto la actividad de la familia de factores de transcripción E2F que regulan la progresión del ciclo celular y la apoptosis. Particularmente, palbociclib (PD-0332991), ha demostrado eficacia especialmente en cáncer de mama avanzado HR+/HER2-, mejorando la supervivencia libre de progresión de desde 18 hasta 27 meses y en cáncer de mama avanzado HR+, palbociclib mostró efectos beneficiosos en comparación con la terapia hormonal, letrozol o fulvestrant cuando se usa solo. Aunque su eficacia se ha demostrado principalmente en el cáncer de mama, se está sometiendo a varios ensayos clínicos en una variedad de otros tipos de cáncer (positivo para Rb), tales como cáncer de pulmón de células escamosas (NCT02785939), tumores neuroendocrinos pancreáticos (NCT02806648) y oligodendroglioma y oligoastrocitoma (NCT02530320).

Tal como se mencionó anteriormente, la selección como diana de los puntos de control del ciclo celular, tales como CDK4 y CDK6 en células cancerosas positivas para Rb y/o con hiperactividad de CDK4 y CDK6, con inhibidores de CDK4/6 específicos mejoró la supervivencia libre de progresión en pacientes con cáncer de mama y este efecto se debe a la adquisición de un nuevo fenotipo por parte de las células cancerosas denominado senescencia celular.

La senescencia celular es un estado por el cual las células pierden su capacidad proliferativa a pesar de ser metabólicamente activas. Las células senescentes también secretan un complejo de moléculas proinflamatorias conocido como fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). El SASP incluye la secreción de citocinas, enzimas, quimiocinas y proteínas inflamatorias de los macrófagos que provocan inflamación y, en algunos casos, puede ser fundamental para la eliminación de células senescentes por fagocitosis. Aunque la mayoría de los tipos de células siguen el programa de senescencia y sus efectos beneficiosos, las células cancerosas tienden a evitar la senescencia celular, lo que da lugar a una proliferación celular descontrolada y a la tumorigénesis. Por este motivo, la inducción de la senescencia, junto con la consecuente eliminación de estas células de los tejidos, se consideran ya una nueva estrategia anticancerígena.

Por tanto, los inhibidores de CDK4/6 se consideran una clase altamente selectiva de productos terapéuticos de nueva generación que se unen al bolsillo de unión a ATP de CDK4 y CDK6, lo que conduce a la inactivación de los complejos CDK4/6-ciclina D con la posterior inhibición de la fosforilación de Rb y la inducción de la detención de la fase G1 y la senescencia celular en las células cancerosas diana. A pesar de estos hallazgos, todavía se están estudiando los mecanismos moleculares específicos por los cuales los inhibidores de CDK4/6 tienen una actividad antitumoral e inducen una detención estable del ciclo celular en las células cancerosas. Esta falta de información no permite estratificar a los pacientes ni desarrollar estrategias terapéuticas para evitar la resistencia a los fármacos con el fin de aumentar la eficacia y la supervivencia libre de progresión de los pacientes con cáncer avanzado.

Por consiguiente, existe una necesidad médica no satisfecha de encontrar nuevas estrategias terapéuticas para

reducir la resistencia a los inhibidores de CDK4/6 y mejorar su eficacia en pacientes con tumores positivos para Rb o en tumores con sobreexpresión o hiperactividad de CDK4 y CDK6, con el fin de mejorar la recaída del cáncer.

La presente invención se centra en resolver este problema proporcionando una nueva estrategia para reducir la actividad de CDK4/6 y Rb y modificar la actividad de otros reguladores del ciclo celular con el fin de aumentar la eficacia de los inhibidores de CDK4/6 y evitar la resistencia a los fármacos, mejorando su eficacia en pacientes con una enfermedad metastásica mejorando la recaída del cáncer. La combinación de la presente divulgación también puede ser útil en el tratamiento de tumores con mutaciones o cambios genéticos que activan la actividad de CDK4 y CDK6, amplificaciones, hiperactividad o sobreexpresión de CDK4 o CDK6, tumores que albergan inactivación de p16INK4a, p15INK4b, y p18INK4c o tumores que sobreexpresan parejas de ciclina de las cinasas dependientes de ciclina (D1, D2, y D3). Esta divulgación también puede ser útil en el tratamiento de tumores negativos para Rb.

[QIN HONG *ET AL*: “Retroviral Delivery of Connexin Genes to Human Breast Tumor Cells Inhibits *in Vivo* Tumor Growth by a Mechanism That Is Independent of Significant Gap Junctional Intercellular Communication”, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 277, n.º 32, 24 de enero de 2002 (24-01-2002), páginas 29132-29138, XP055870639, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M200797200] muestran que la sobreexpresión de conexina 43 en MDA-MB-231 dio como resultado la supresión del crecimiento de tumor cuando se implanta en ratones (resumen, figura 4).

[LI TIANQI *ET AL*: “Ribociclib (LEE011) suppresses cell proliferation and induces apoptosis of MDA-MB-231 by inhibiting CDK4/6-cyclin D-Rb-E2F pathway”, ARTIFICIAL CELLS, NANOMEDICINE AND BIOTECHNOLOGY, vol. 47, n.º 1, 7 de octubre de 2019 (07-10-2019), páginas 4001-4011, XP055870647, US ISSN: 2169-1401, DOI: 10.1080/21691401.2019.1670670] divulgan que ribociclib suprimió el crecimiento de tumores xenoinjerto de MDA-BM-231 *in vivo* (resumen, figura 5).

[ROBINSON TYLER J. W. *ET AL*: “RB1 Status in Triple Negative Breast Cancer Cells Dictates Response to Radiation Treatment and Selective Therapeutic Drugs”, PLOS ONE vol. 8, n.º 11, 1 de enero de 2013 (01-01-2013), página e78641, XP055870642, DOI: 10.1371/journal.pone.0078641] divulgan que MDA-MB-231 tienen un gen Rb funcional (figura 1, resumen).

[ZHANG YOU-WEI *ET AL*: “Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27<sup>ONCOGENE</sup> vol. 20, n.º 31, 1 de julio de 2001 (01-07-2001), páginas 4138-4149, XP05587062, London ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/sj.onc.1204563] divulgan que sobreexpresar conexina 43 suprimió la proliferación de células de osteosarcoma humano U2OS, provocado por la acumulación de proteína de retinoblastoma hiperfosforilada, que se relacionaba con disminuciones en la actividad de CDK2 y CDK4 (resumen). Las células que sobreexpresan conexina 43 tenían un crecimiento tumoral reducido *in vivo* (figura 1F).

[Documento WO 2021/018879 A1 (FUND PROFESOR NOVOA SANTOS [ES]; UNIV SANTIAGO COMPOSTELA [ES] *ET AL.*) 4 de febrero de 2021 (04-02-2021)] divulga polipéptidos de conexina 43 (reivindicación 1) para su uso en el tratamiento de cáncer entre otros (reivindicación 9).

[Documento WO 02/069896 A2 (NORTHWEST BIOTHERAPEUTICS INC [US]; HUANC RUO-PAN [US] *ET AL.*) 12 de septiembre de 2002 (12-09-2002)] divulga métodos de inhibición de la proliferación de células tumorales en un mamífero que comprende la administración de una proteína conexina o un ácido nucleico que codifica para una conexina (reivindicaciones 1, 14), que es conexina 43 (reivindicaciones 3, 16) y el tumor es carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia o melanoma (reivindicaciones 5, 18) o glioblastoma (reivindicaciones 6, 19). La conexina 43 indujo apoptosis de células tumorales en combinación con efectos terapéuticos (página 50, línea 17-página 58, ejemplo 1).

[Documento CN 111 377 935 B (WUHAN GUANGGU GENERAL DRUG RES INSTITUTE CO LTD) 29 de junio de 2021 (29-06-2021)] divulga inhibidores de CDK4/6 (reivindicaciones 1-5) para su uso en el tratamiento de cáncer (reivindicaciones 7-11). Tanto los cánceres RB+ como Rb- son tratables (párrafo 38).

Ninguno de los documentos de la técnica anterior divulga una composición que comprenda una combinación de conexina 43 y un inhibidor de CDK4/6, o conexina 43 para su uso en el tratamiento de cáncer antes, después o simultáneamente a un tratamiento con un inhibidor de CDK4/6.

## Descripción de la invención

### Breve descripción de la invención

Tal como se explicó anteriormente, la presente invención proporciona una nueva estrategia destinada a reducir la resistencia a los inhibidores de CDK4/6 mejorando su eficacia en pacientes con tumores positivos para Rb, mejorando así la recaída del cáncer.

Particularmente, según los resultados mostrados a continuación, los inventores de la presente invención demuestran que el uso de Cx43, en combinación con inhibidores de CDK4/6, aumenta significativamente la eficacia de los

inhibidores de CDK4/6. Además, se ha sometido a prueba la combinación de Cx43, inhibidores de CDK4/6 y fármacos senolíticos, tales como navitoclax, y esta combinación dio como resultado la mejor estrategia para reducir la proliferación de células de cáncer de mama positivas para Rb.

5 Específicamente, los resultados divulgados en la presente invención muestran que el restablecimiento de Cx43 en células cancerosas positivas para Rb induce la detención de la proliferación (véase el ejemplo 2.1 y la figura 1) e induce un fenotipo similar al senescente en células cancerosas positivas para Rb (véase el ejemplo 2.2 y la figura 2). Cx43 aumenta la eficacia de los inhibidores de CDK4/6 (véase el ejemplo 2.3 y la figura 3). Además, la combinación de Cx43 e inhibidores de CDK4/6 mejora el efecto y la eficacia del fármaco senolítico navitocax (véase el ejemplo 10 2.4 y la figura 4), Cx43 también aumenta la eficacia de los inhibidores de CDK4/6 en otros tipos de tumores (véase el ejemplo 2.5 y la figura 5) y la administración de Cx43 usando vesículas (sEV) tiene actividad antitumoral y mejora la eficacia de CDK4/6i (véase el ejemplo 2.6 y la figura 6). Además, tal como se muestra en el ejemplo 2.7 y la figura 7, los niveles de Cx43 se correlacionan con la respuesta a los inhibidores de CDK4/6.

15 Hay que tener en cuenta que se han obtenido nuevos datos que confirman un efecto sinérgico cuando se combinan conexina 43 y los inhibidores de CDK4/6, representado por una mayor reducción en la capacidad de formación de colonias de células de cáncer de mama HR+/HER2- en comparación con cuando se usan solos conexina 43 y los inhibidores de CDK4/6 (véase la figura 3c). Para demostrar el efecto sinérgico, se evaluó la CI50 del inhibidor de CDK4/6, palbociclib, en células tumorales MCF7 y células MCF7 que sobreexpresan conexina 43. Tal como se muestra en la figura 3b, el restablecimiento de conexina 43 dio como resultado una reducción significativa de la CI50 de palbociclib, lo que significa que se necesita una concentración más baja del fármaco en presencia de conexina 43 para obtener el mismo efecto que en aquellas células que no contienen Cx43 (MCF7 EV). Estos resultados se confirmaron adicionalmente mediante el uso de una línea celular de cáncer de mama positiva para Rb diferente (T47D) que contiene niveles más bajos de conexina 43 en comparación con las células MCF7-Cx43 (figura 7a de la solicitud PCT). De hecho, la presencia de conexina 43 se asocia con una menor CI50 de palbociclib, tal como se muestra en la tabla de la figura 7d, en la que se muestra que la CI50 inicial de palbociclib (282,1 nM) desciende hasta 120,6 nM y luego hasta 66,82 nM. Esto demuestra un claro efecto sinérgico. Además, se ha aumentado el número de experimentos en la figura 3c para demostrar el efecto y los datos sin procesar indican que palbociclib reduce la proliferación celular alrededor del 40 % en comparación con el control sin tratar. Según la figura 3c de la solicitud PCT, las células que expresan conexina 43 reducen su proliferación en un 50 %, sin embargo, la combinación de tanto Cx43 como palbociclib mostró una reducción del 19% en la proliferación celular. En otras palabras, el efecto logrado por la combinación de Cx43 y el inhibidor de CDK4/6 es mayor que la suma de los reactivos individuales.

35 En la misma línea, se ha incluido la cuantificación en la figura 4d para demostrar que la combinación triple de conexina 43, inhibidor de CDK4/6 y navitoclax, dio como resultado la mejor estrategia para eliminar células senescentes y aumentar la eficacia de ambos fármacos. Tal como se muestra en la figura 4d de la solicitud PCT, la proliferación en las células tratadas con la combinación triple fue significativamente menor en comparación con los tratamientos con palbociclib y Cx43 por separado.

40 Así, la primera realización de la presente invención se refiere a Cx43 para su uso en el tratamiento de cáncer antes, después o simultáneamente a un tratamiento con un inhibidor de CDK4/6, en donde el cáncer está caracterizado por la presencia del gen de retinoblastoma (RB) funcional y/o por hiperactividad de CDK4/6. Hay que tener en cuenta que los tipos de cáncer caracterizados por la presencia del gen de retinoblastoma (RB) funcional (lo que significa que el RB está activo y los niveles de proteína pRb no se agotan significativamente) están bien establecidos en la técnica anterior, tal como se indica, por ejemplo, en estos documentos: [Goel S, DeCristo MJ, McAllister SS, Zhao J.J. CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest. Trends Cell Biol. 2018;28(11):911-25], [Condorelli R, Spring L, O'Shaughnessy J, Lacroix L, Bailleux C, Scott V, *et al.* Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK4/6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. Ann Oncol. 2018;29(3):640-5] o [Pandey K, An HJ, Kim SK, Lee SA, Kim S, Lim SM, *et al.* Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A review. Int J Cancer. 2019;145(5):1179-88].

55 En una realización preferida de la presente invención, el inhibidor de CDK4/6 se selecciona de: abemaciclib, palbociclib y/o ribociclib.

60 Así, la realización preferida de la presente invención es la conexina 43 para su uso en el tratamiento de cáncer antes, después o simultáneamente a un tratamiento con un inhibidor de CDK4/6, en donde el cáncer está caracterizado por la presencia de un gen de retinoblastoma (RB) funcional. El inhibidor de CDK4/6 puede seleccionarse de: abemaciclib, palbociclib y/o ribociclib.

65 En una realización preferida de la presente invención, el cáncer que está caracterizado por la presencia del gen de retinoblastoma (RB) funcional se selecciona de la lista que comprende: cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, colon, cáncer de pulmón de células escamosas, tumor neuroendocrino pancreático, oligodendroglioma y oligoastrocitoma entre otros.

En una realización preferida de la presente invención, el cáncer está caracterizado por la inactivación de p16INK4a,

5 p15INK4b, y p18INK4c o tumores que sobreexpresan parejas de ciclina de las cinasas dependientes de ciclina (D1, D2, y D3). Esta divulgación también puede ser útil en el tratamiento de tumores negativos para Rb y seleccionados de la lista que comprende: cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células escamosas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de vías urinarias, tumor neuroendocrino pancreático, oligodendroglioma y oligoastrocitoma, tumores hematopoyéticos de linaje linfoide.

10 La segunda realización de la presente invención se refiere a un medicamento de combinación que comprende Cx43 y un inhibidor de CDK4/6.

15 En una realización preferida de la presente invención, el medicamento de combinación comprende proteína Cx43 o ARNm de Cx43.

20 En una realización preferida de la presente invención, el inhibidor de CDK4/6 incluido en el medicamento de combinación se selecciona del grupo que comprende: abemaciclib, palbociclib y/o ribociclib.

25 En una realización preferida de la presente invención, el medicamento de combinación comprende además un agente senolítico, preferiblemente navitoclax.

30 La tercera realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el medicamento de combinación de la invención y, opcionalmente, excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

35 La cuarta realización de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de cáncer, en donde el cáncer está caracterizado por la presencia del gen de retinoblastoma (RB) funcional.

40 En una realización preferida de la presente invención, Cx43 se administra usando un vehículo de administración.

45 En una realización preferida de la presente invención, el vehículo de administración es una nanopartícula, una vesícula, una vesícula extracelular o un vector de expresión. Particularmente, para este propósito puede usarse cualquiera de las vesículas extracelulares conocidas en la técnica anterior [Guillaume van Niel, *et al.*, 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, volumen 19, páginas 213-228(2018)] [Oscar P. B. Wiklander *et al.*, 2019. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Science Translational Medicine*. 15 de mayo 2019. Vol. 11, publicación 492, eaav8521. DOI: 10.1126/scitranslmed.aav8521].

50 En una realización preferida de la presente invención, el vector de expresión codifica para el ARNm de Cx43 que a su vez se traduce en proteína Cx43.

55 En el presente documento se divulga un método para tratar el cáncer, en donde el cáncer está caracterizado por la presencia de un gen de retinoblastoma (RB) funcional y/o por la hiperactividad de CDK4/6, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de Cx43 en combinación con un inhibidor de CDK4/6, y preferiblemente, también en combinación con un agente senolítico (tal como se definió anteriormente), o una composición farmacéutica que comprende los mismos.

60 En el contexto de la presente invención se definen los siguientes términos:

- 65 • El término “que comprende” significa que incluye, pero no se limita a, todo lo que sigue a la palabra “que comprende”. Por tanto, el uso del término “que comprende” indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes.
- “Que consiste en” significa que incluye, y se limita a, todo lo que sigue a la expresión “que consiste en”. Por tanto, la expresión “que consiste en” indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, y que no puede haber otros elementos presentes.
- “Excipiente o portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a un excipiente que puede incluirse opcionalmente con la suspensión celular de la invención y que no provoca efectos toxicológicos adversos significativos para el paciente.
- Por “dosis o cantidad terapéuticamente eficaz” de una composición que comprende la suspensión celular de la invención se entiende una cantidad que, cuando se administra tal como se describe en el presente documento, produce una respuesta terapéutica positiva en un sujeto que tiene cáncer. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad, el estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se trata, el modo de administración, y similares. Un experto habitual en la técnica podrá determinar una cantidad “eficaz” apropiada en cada caso individual usando experimentación de rutina,

basándose en la información proporcionada en el presente documento.

- Por “tipos de cáncer caracterizados por la presencia del gen de retinoblastoma (RB) funcional” se entiende cualquier tipo de cáncer en el que el RB está activo y los niveles de proteína pRb no están significativamente agotados, o tumores positivos para Rb. Este tipo de cáncer pertenece al conocimiento general común y se cita en varios documentos como: [Knudsen ES, Wang JY (febrero de 2010). “Targeting the RB-pathway in cancer therapy”. *Clinical Cancer Research*. 16 (4): 1094-9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0787. PMC 2822892. PMID 20145169], [Goel S, DeCristo MJ, McAllister SS, Zhao JJ. CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest. *Trends Cell Biol*. 2018;28(11):911-25], [Condorelli R, Spring L, O’Shaughnessy J, Lacroix L, Bailleux C, Scott V, *et al*. Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK4/6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2018;29(3):640-5] o [Pandey K, An HJ, Kim SK, Lee SA, Kim S, Lim SM, *et al*. Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A review. *Int J Cancer*. 2019;145(5):1179-88].

## 15 Descripción de las figuras

Figura 1. Cx43 en células cancerosas positivas para Rb induce la detención de la proliferación. (a) Niveles de proteína Cx43 y ARNm de Cx43 en células de cáncer de mama positivas para Rb. (b) Las células de cáncer de mama positivas para Rb (MCF7) se infectaron con un vector para sobreexpresar Cx43. Los niveles de proteína Cx43 y ARNm de Cx43 se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western (proteína) y qPCR (ARNm) comparando el control vectorial (vector vacío; EV) con células MCF7 que sobreexpresaban Cx43 (Cx43). Se usó tubulina como control de carga. (c) Inmunofluorescencia que muestra la sobreexpresión y localización de Cx43 en células MCF7. (d) Inmunotransferencia de tipo Western que demuestra que Cx43 se localiza en la membrana plasmática de las células MCF7 después de la sobreexpresión de Cx43, en comparación con EV. Se usó Ponceau como control de carga. (e) Ensayo de formación de colonias para demostrar que la sobreexpresión de Cx43 induce la detención de la proliferación en células MCF7 después de 7 días de cultivo. (f) Liberación de ATP que muestra un aumento de la actividad de los hemicanales tras el restablecimiento de Cx43 en células MCF7. (g) Ensayo de paracaídas para confirmar la comunicación intercelular por unión comunicante. Se muestra la cuantificación a la derecha. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. Se usó la prueba de la t de Student bilateral para calcular la significancia representada de la siguiente manera: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,01$ .

Figura 2. Cx43 induce un fenotipo similar al senescente en células cancerosas positivas para Rb. (a) La inmunotransferencia de tipo Western muestra la regulación por incremento de los marcadores de senescencia p53 y p21<sup>CIP1</sup> y una reducción en los niveles totales de RB cuando las células sobreexpresan Cx43. Se usaron tubulina y Ponceau como controles de carga. (b) Imágenes representativas de p21<sup>CIP1</sup> (rojo) de MCF7 después de la sobreexpresión de Cx43. (c) Mapa de calor de la expresión del gen de SASP en células MCF7 que expresan el vector de control o Cx43. Se muestra la media de 3 experimentos independientes. El gráfico representa los niveles de ARNm de p21<sup>CIP1</sup> en MCF7 tras la sobreexpresión de Cx43. (d) Actividad SA- $\beta$ -galactosidasa para detectar células senescentes (azul) en MCF7 que expresan Cx43 mostrada por imágenes de microscopía óptica. (e) Los gráficos muestran los niveles de ARNm de Cx43 y Bcl2 en células MCF7 que expresan Cx43 y el control vectorial (EV). (f) Inmunotransferencia de tipo Western de los marcadores de apoptosis Bcl2 y Bax. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 2-3 experimentos independientes. Se usó la prueba de la t de Student bilateral para calcular la significancia representada de la siguiente manera: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,01$ .

Figura 3. Cx43 aumenta la eficacia de los inhibidores de CDK4/6. (a) Inmunotransferencia de tipo Western para los niveles de proteína Cx43 después de 7 días de tratamiento con palbociclib (PB) 500 nM en comparación con el control sin tratar (UT). La gráfica representa la cuantificación de 3 experimentos independientes. Se usó Ponceau como control de carga. (b) Curva de dosis-respuesta a palbociclib en células MCF7 que expresan el control vectorial (EV) y tras el restablecimiento de Cx43 (MCF7 Cx43). Los cálculos de CI50 se muestran en las tablas. (c) Capacidad de formación de colonias de células MCF7 que expresan el control vectorial (EV) o la sobreexpresión de Cx43 (Cx43) y tratadas con palbociclib 500 nM durante 7 días. (d) Niveles de proteína p21<sup>CIP1</sup> en MCF7 después de la sobreexpresión de Cx43 y 7 días de tratamiento con palbociclib. La cuantificación se muestra a la derecha. Se usó Ponceau como control de carga. (e) Imágenes representativas de la actividad SA- $\beta$ -galactosidasa en MCF7 que expresan EV o Cx43 y tratadas con palbociclib durante 7 días. Las imágenes se tomaron usando un microscopio óptico. (f) Se usó tinción con violeta de cristal para verificar la capacidad de formación de colonias de MCF7 que expresan EV o Cx43 tratadas con abemaciclib (AB) 500 nM durante 7 días. La cuantificación se muestra a la derecha. (g) Capacidad de formación de colonias de células MCF7 que sobreexpresan Cx43 después de 7 días de tratamiento con el inhibidor de CDK4/6 ribociclib (RB). La cuantificación se muestra a la derecha. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 2-3 experimentos independientes. Se usó la prueba de la t de Student bilateral para calcular la significancia representada de la siguiente manera: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,01$ .

Figura 4. La combinación de Cx43 e inhibidores de CDK4/6 potencia el efecto del fármaco senolítico navitocax. (a) Capacidad de formación de colonias de células MCF7 que expresan el control vectorial (EV) o Cx43 (Cx43) y tratadas con palbociclib 500 nM durante 7 días y 24 horas con navitoclax (N) 5  $\mu$ M. (b) Niveles de proteínas Cx43 y p21 en MCF7 después de la sobreexpresión de Cx43 y 7 días de tratamiento con palbociclib y 24 horas con navitoclax (N) 5  $\mu$ M. Las cuantificaciones se muestran a la derecha. Se usó Ponceau como control de carga. (c)

Imágenes representativas de la actividad SA-β-galactosidasa en MCF7 que expresan EV o Cx43 y tratadas con palbociclib durante 7 días y 24 horas con navitoclax (N) 5 μM. Las imágenes se tomaron usando un microscopio óptico. (d) Ensayo de formación de colonias de células MCF7 que expresan el control vectorial (EV) o la sobreexpresión de Cx43 (Cx43) y tratadas con palbociclib 500 nM durante 14 días y navitoclax (N) 3,5 μM durante 7 días. La cuantificación de la combinación triple se muestra a la derecha. Los datos representan la media ± EEM de 2-3 experimentos independientes. Se usó la prueba de la t de Student bilateral para calcular la significancia representada de la siguiente manera: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,01.

Figura 5. Cx43 aumenta la eficacia de los inhibidores de CDK4/6 en otros tipos de tumores. (a) Inmunotransferencia de tipo Western de células de melanoma humano A375 después de la transfección con un vector para sobreexpresar Cx43. Se muestran los niveles de proteínas Rb y Cx43. Se usó Ponceau como control de carga. EV (control vectorial); Cx43 (células que sobreexpresan Cx43). (b) Ensayo de formación de colonias de la línea celular A375 después de 7 días de tratamiento con palbociclib (PB) 250 nM y abemaciclib (AB) y ribociclib (RB) 500 nM. (c) Inmunotransferencia de tipo Western de células de adenocarcinoma de colon HT29 después de la transfección. Se muestran los niveles de proteínas Rb y Cx43. Se usó Ponceau como control de carga. EV (control vectorial); Cx43 (células que sobreexpresan Cx43). (d) Proliferación de células de colon HT29 después de 7 días de tratamiento con palbociclib (PB) 250 nM y abemaciclib (AB) y ribociclib (RB) 500 nM. Los datos representan la media ± EEM de 2-3 experimentos independientes. Se usó la prueba de la t de Student bilateral para calcular la significancia representada de la siguiente manera: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,01.

Figura 6. La administración de Cx43 usando vesículas (sEV) tiene una potente actividad antitumoral y mejora la eficacia de CDK4/6i. (a) Inmunotransferencia de tipo Western que muestra que Cx43 está presente en altos niveles en sEV aisladas de HEK-293, usadas como vehículo de administración para aumentar Cx43 en células tumorales. Se usaron CD9 y CD63 como marcadores para confirmar la presencia de sEV en comparación con el lisado celular (CL). (b) Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) de sEV aisladas de HEK293T. Los gráficos representan el número de partículas, las partículas/célula y el tamaño de partícula. (c) Experimento de internalización durante la noche de sEV aisladas de HEK en células diana MCF7. (d) Ensayo de formación de colonias de células de cáncer de mama MCF7 tratadas con palbociclib 500 nM, abemaciclib 1 μM y ribociclib 1 μM solos o en combinación con sEV positivas para Cx43 aisladas de HEK293 durante 7 días. La presencia de sEV enriquecidas en Cx43 disminuye la capacidad de formar colonias y aumenta la eficacia del tratamiento. Los tratamientos y las sEV se renovaron cada 48 h. -sEV (controles sin tratar), sEV-Cx43+ (sEV derivadas de HEK-293). (e) Inmunotransferencia de tipo Western que muestra que las sEV aisladas de células MCF7 restablecidas (Cx43) contienen altos niveles de Cx43. Se usaron CD9 y tubulina como marcadores para confirmar la presencia de sEV en comparación con el lisado celular (CL). (f) Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) de sEV aisladas de células MCF7 que expresan el control vectorial (EV) o Cx43 (Cx43). Los gráficos representan el número de partículas, las partículas/célula y el tamaño de partícula. (g) Experimento de internalización durante la noche de sEV aisladas de células MCF7 que expresan el control vectorial (EV) o Cx43 (Cx43) en células diana MCF7. Los datos representan la media ± EEM de 3 experimentos independientes. (h) Ensayo de formación de colonias de células de cáncer de mama MCF7 tratadas con sEV aisladas de MCF7-EV o MCF7-Cx43 durante 7 días. Se usó la prueba de la t de Student bilateral para calcular la significancia representada de la siguiente manera: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,01.

Figura 7. Los niveles de Cx43 se asocian con la respuesta a los inhibidores de CDK4/6 en células de cáncer de mama HR+/HER2-. (a) Inmunotransferencia de tipo Western de células MCF7 (EV y Cx43) y T47D. Se muestran los niveles de proteína Cx43. Se usó tubulina como control de carga. (b) Inmunofluorescencia de Cx43 en células T47D en comparación con MCF7. (c) Curva de dosis-respuesta a palbociclib en la línea celular T47D. El cálculo de CI50 se muestra en la tabla. (d) Comparación de los niveles de proteína Cx43 y la respuesta a palbociclib en líneas celulares de cáncer de mama HR+/HER2-. (e) Ensayo de formación de colonias de células T47D tratadas durante 7 días con diferentes concentraciones de inhibidores de CDK4/6: palbociclib (PB), abemaciclib (AB) y ribociclib (RB). Las cuantificaciones se muestran a la derecha. (f) Niveles de ARN de Cx43, p21 y los factores de SASP IL6, IL8 y MMP9 después de 7 días de tratamiento con palbociclib. (g) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de Cx43 en células T47D tras el tratamiento con palbociclib durante 7 días. (h) Ensayo de formación de colonias de células de cáncer de mama T47D tratadas con palbociclib, abemaciclib y ribociclib solos o en combinación con sEV positivas para Cx43 (sEV-Cx43+) aisladas de HEK293 durante 7 días. La presencia de sEV enriquecidas en Cx43 disminuye la capacidad de formar colonias y aumenta la eficacia del tratamiento. Los tratamientos y sEV se renovaron cada 48 h. Los datos representan la media ± EEM de 3 experimentos independientes. Se usó la prueba de la t de Student bilateral para calcular la significancia representada de la siguiente manera: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,01.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se ilustra mediante los ejemplos que se exponen a continuación sin intención de limitar su alcance de protección.

#### Ejemplo 1. Materiales y métodos

##### Ejemplo 1.1. Cultivo celular

Las líneas celulares positivas para Rb MCF7 (cáncer de mama), T47D (cáncer de mama) y A375 (melanoma) se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Lonza) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Se cultivó HT29 (adenocarcinoma de colon) en medio 5A de McCoy (Sigma-Aldrich) suplementado con FBS al 10 % y penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml. Las células se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada con el 5 % de CO<sub>2</sub> (SANYO CO<sub>2</sub>). El medio se cambió cada 2 días.

#### Ejemplo 1.2. Infección retroviral

Se usó una infección retroviral para sobreexpresar Cx43 en células MCF7. Las partículas retrovirales se generaron transfectando los plásmidos pLPCX-Cx43 y pLPCX-EV, amablemente donados por el Dr. Trond Aasen, y los plásmidos auxiliares retrovirales (vsug y gag-pol) con polietiliminina (PEI) en células de empaquetamiento HEK293T durante 48 h. Luego, el sobrenadante se filtró con filtros de 0,45 µm y se aplicó a células MCF7 en presencia de Polybrene 4 µg/ml (bromuro de hexadimetrina; Sigma-Aldrich) después de 3 rondas de infección. Posteriormente se seleccionaron células con la resistencia a los antibióticos adecuada usando puromicina 0,5 µg/ml (Sigma).

#### Ejemplo 1.3. Transfección celular

Las líneas celulares (A375 y HT29) se transflectaron mediante electroporación para sobreexpresar Cx43. El kit Amaxa® Cell Line Nucleofector® V (Lonza) se usó para transflectar células en un dispositivo Cell Line Nucleofector™ (Lonza). Se recogió un millón de células y se resuspendieron en 100 µl de disolución Nucleofector®. Se añadieron 3 µg del plásmido correspondiente y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación usando el programa U-28. Las líneas celulares se transflectaron con el constructo de plásmido pIRESpuro2 (Clontech) que contiene la secuencia de Cx43 humana, amablemente donada por Arantxa Tabernero (Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca, España). Las células transflectadas se sembraron en medio de cultivo y 24 horas (h) después de la transfección el medio se reemplazó con medio completo que contenía diclorhidrato de puromicina (Tocris, Bioscience) en diferentes concentraciones dependiendo de la línea celular (de 0,5 µg/ml a 2 µg/ml).

#### Ejemplo 1.4. Tratamiento con inhibidores de CDK4/6

Las células se trataron con palbociclib 250 nM (PD0332991) (APEX-BIO), abemaciclib 500 nM (LY2835219) (Selleckchem) o ribociclib 500 nM (LEE011) (Selleckchem) durante 7 días. Todos los tratamientos se realizaron usando DMEM suplementado con FBS al 10 % y penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml. Los medios se reemplazaron cada 2 días.

#### Ejemplo 1.5. Inmunofluorescencia

Las células se hicieron crecer en cubreobjetos y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Luego, las células se lavaron dos veces con PBS y se permeabilizaron mediante incubación con Triton X-100 (Sigma) al 0,2 % en PBS durante 10 min a TA. Después de un lavado con PBS, las células se bloquearon durante 30 min a TA usando BSA al 1 % en PBS suplementado con Tween-20 (PBST) al 0,1 %. Los anticuerpos primarios se diluyeron en BSA-PBST al 1 % y se incubaron durante la noche (anticuerpo anti-Cx43 (#C6219), Sigma-Aldrich 1:1000; anticuerpo anti-tubulina (T9026)). Luego, las células se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios durante 1 h a TA. Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP usados fueron anticuerpo anti-IgG de ratón (NA-931, Sigma-Aldrich) y anticuerpo anti-IgG de conejo (A6154, Sigma-Aldrich).

#### Ejemplo 1.6. Ensayo de formación de colonias

Los ensayos de formación de colonias se realizaron sembrando de  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 6-12 pocillos y se hicieron crecer durante de 7-15 días. El medio se reemplazó cada 48 h. Las células se lavaron con solución salina tibia y se fijaron con PFA frío al 4 % durante 15 min. Las células se lavaron con PBS y se tiñeron con el 0,05 % de violeta cristal (Sigma-Aldrich) durante 15 min. Después de la tinción, las células se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. Las colonias se cuantificaron diluyendo violeta cristal en ácido acético al 30 % y se recogieron 100 µl de la disolución para medir la absorbancia a 570 nm usando un lector de microplacas NanoQuant Infinite M200 (TECAN).

#### Ejemplo 1.7. Cálculo de CI50

Las CI50 se calcularon usando cultivos celulares de células MCF7 (EV y Cx43) y T47D tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de CDK4/6, palbociclib, durante 7 días. Las células se tiñeron con violeta cristal y se evaluó el número de células midiendo la absorbancia a 570 nm.

#### Ejemplo 1.8. Tinción de β-galactosidasa

Las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura

ambiente. Las células se lavaron una segunda vez con PBS y se incubaron con disolución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-piranosido (X-gal) durante la noche a 37 °C (kit de tinción histoquímica de células senescentes, ref. CS0030-1KT; Sigma). Se obtuvieron imágenes de las células usando un microscopio óptico con un aumento de 20X y se tomaron imágenes representativas individuales de cada pocillo.

5

Ejemplo 1.9. Extracción de ARN y reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-qPCR)

El ARN total se aisló de las células usando el reactivo TRI Reagent® RT (Vitro Bio), según el protocolo del fabricante. Se añadieron 200 µl de cloroformo a los tubos y las muestras se incubaron durante 10 min a 4 °C y, luego se centrifugaron a 14.000 g durante 15 min a 4 °C. Después de la centrifugación, se obtuvo la fase acuosa (superior) y se transfirió a un nuevo tubo con 500 µl de isopropanol y las muestras se agitaron con vórtex durante 15 s. Los tubos se centrifugaron a 14.000 g durante 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y los sedimentos de ARN se lavaron con 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugaron durante 5 min a 7.000 g a 4 °C. Se descartaron los sobrenadantes y los sedimentos de ARN se secaron al aire. El ARN se trató con ADNasa I, libre de ARNasa (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras de ARN se cuantificaron en un Nanodrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Se usó 1 µg de ARN para sintetizar ADN complementario (ADNc) con la mezcla maestra Superscript™ IV VILO™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras de ADNc se cuantificaron en un Nanodrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) y se resuspendieron en agua libre de ADNasa/ARNasa/proteasa (Sigma-Aldrich).

10

15

20

Ejemplo 1.10. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Se mezclaron 5 µl de ADNc (1 µg) con 0,5 µl de mezcla de cebadores (10 µM de cada cebador), 10 µl de mezcla maestra PowerUP™ SYBR™ Green de Applied Biosystems™ (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) y se completó con dH<sub>2</sub>O hasta 20 µl por pocillo en el sistema LightCycler® 480 (Roche). El programa consistió en un primer ciclo de desnaturalización de 10 min a 95 °C seguido de 30-55 ciclos de amplificación de 10 segundos (s) a 95 °C, 30 s a 60 °C para hibridación y 12 s a 72 °C para extensión. Los cebadores usados se enumeran a continuación:

25

Nombre del gen	Secuencia directa (5'-3')	Secuencia inversa (5'-3')
CDKN1A (p21)	GACTCTCAGGGTCGAAAACG (SEQ ID NO: 1)	GCCAGGGTATGTACATGAGGA (SEQ ID NO: 2)
GJA1 (Cx43)	ACATGGGTGACTGGAGCGCC (SEQ ID NO: 3)	ATGATCTGCAGGACCCAGAA (SEQ ID NO: 4)
IL1β	CGAATCTCCGACCACACTAC (SEQ ID NO: 5)	TCCATGGCCACAACA ACTGA (SEQ ID NO: 6)
IL6	TGTAGCCGCCACACA (SEQ ID NO: 7)	GGATGTACCGAATTTGTTTGTGTA (SEQ ID NO: 8)
IL8	TTGGCAGCCTTCCTGATTTC (SEQ ID NO: 9)	TCTTTAGCACTCCTTGGCAAAAC (SEQ ID NO: 10)
MMP9	TTCATCTTCCAAGGCCAATC (SEQ ID NO: 11)	GGGCTGAACCTGGTAGACAG (SEQ ID NO: 12)
HPRT1	TTGAGTTTGGAAACATCTGGAG (SEQ ID NO: 13)	GCCCAAAGGGA ACTGATAGTC (SEQ ID NO: 14)

30

Ejemplo 1.11. Aislamiento de, caracterización de y tratamiento con vesículas extracelulares pequeñas (sEV)

Las células HEK 293T se sembraron en matraces de cultivo de 162 cm<sup>2</sup> (Corning, Sigma-Aldrich) hasta confluencia (80 % - 90 %). Las células se lavaron tres veces con PBS y se cultivaron durante 48 h en DMEM con FBS al 0 %. Se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 min. Se descartó el sedimento y los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm y luego los sobrenadantes filtrados se centrifugaron a 100.000 g durante 90 min a 4 °C (ultracentrifuga Optimal-90K) usando un rotor de 70 Ti (Beckman Coulter). Se descartaron los sobrenadantes y se lavaron sEV que contenían sedimento con PBS y se centrifugaron a 100.000 g durante 90 min a 4 °C. El sedimento con sEV se resuspendió en medio de cultivo. Las células diana (células MCF7 o T47D) se trataron con sEV en presencia/ausencia de inhibidores de CDK4/6 durante 48 h. Se realizaron 3 rondas de tratamiento. Para el análisis NTA con Nanosight NS300 y la determinación del contenido de proteína y ARN de sEV, se realizó una segunda ultracentrifugación con PBS y el sedimento de sEV se resuspendió en PBS. Para el seguimiento de las sEV, el sedimento de sEV se tiñó con Dil 1 µM (Invitrogen) durante 1 h a 37 °C, se añadió a las células diana durante la noche y se observó con un microscopio Olympus BX61. Las sEV de células MCF7 que expresaban el control vectorial (VE) o Cx43 se aislaron y caracterizaron siguiendo el mismo procedimiento.

35

40

45

Ejemplo 2. Resultados

## Ejemplo 2.1. Cx43 en células cancerosas positivas para Rb induce detención de la proliferación

La línea celular de cáncer de mama HR+/HER2- (MCF7) no expresa Cx43 a niveles de proteína y ARNm tal como se muestra en la figura 1a. En este caso se usó la línea celular de cáncer de mama humano MCF7 para sobreexpresar Cx43. Cx43 se sobreexpresó usando un vector retroviral y la sobreexpresión de la proteína se confirmó usando inmunotransferencia de tipo Western (proteína) y RT-PCR (niveles de ARNm) (figura 1b). Dado que la actividad y/o función de las conexinas dependen de su localización, se verificó la localización de Cx43 en células MCF7 que sobreexpresan Cx43 usando inmunofluorescencia (figura 1c) e inmunotransferencia de tipo Western (figura 1d). Tal como se muestra en la figura 1c, Cx43 se localizó principalmente en la membrana plasmática (en rojo) en comparación con las células MCF7 que expresan el control vectorial (EV) que expresan niveles muy bajos de Cx43. Además, la inmunotransferencia de tipo Western de fracciones celulares de citoplasma (solubles) y membrana (insolubles) aisladas usando un kit comercial, confirmó que las células MCF7 que sobreexpresan Cx43 tienen Cx43 ubicada en la membrana plasmática (figura d). Se ha demostrado que la sobreexpresión de Cx43 induce la detención de la proliferación en diferentes células cancerosas. Para determinar si la sobreexpresión de Cx43 en células MCF7 afecta a la proliferación celular, se realizó un ensayo de formación de colonias. Las células se sembraron en placa a baja densidad y se cultivaron durante 7 días. Tal como se muestra en la figura 1e, la sobreexpresión de Cx43 redujo significativamente la proliferación celular y la capacidad de formación de colonias en las células MCF7 después de 7 días de cultivo. Además, se sometió a prueba si la sobreexpresión de Cx43 restablece la comunicación de célula a célula en las células MCF7. Tal como se muestra en las figuras 1f-g, el restablecimiento de Cx43 en células de cáncer de mama HR+/HER2- conduce a un aumento en la actividad de los hemicanales y la comunicación intercelular por unión comunicante.

## Ejemplo 2.2. Cx43 induce un fenotipo similar al senescente en células cancerosas positivas para Rb

Para comprender el mecanismo por el cual la sobreexpresión de Cx43 reduce la proliferación celular en células de cáncer de mama positivas para Rb, se decidió verificar si las células MCF7 que sobreexpresan Cx43 adquieren un fenotipo similar al senescente. Tal como se muestra en la figura 2a, la sobreexpresión de Cx43 aumenta los niveles de los marcadores de senescencia p21 y p53 acompañado de una reducción en los niveles de Rb confirmando un retraso en el ciclo celular en comparación con el control vectorial (EV). El aumento de los niveles de p21 también se confirmó usando inmunofluorescencia (figura 2b). Además, Cx43 aumenta la actividad  $\beta$ -galactosidasa, una característica clave de las células senescentes, en MCF7, lo que confirma la inducción de un fenotipo senescente después de la sobreexpresión de Cx43 (figura 2d). Además, se analizó la secreción de factores de SASP tras la sobreexpresión de Cx43 usando qPCR. La sobreexpresión de Cx43 en células MCF7 aumenta la secreción de diferentes citocinas, tales como IL6, IL8 y MMP9, junto con un aumento de la expresión génica del marcador de senescencia p21 (figura 2c). Además, los presentes datos indican que el restablecimiento de Cx43 induce la muerte celular por apoptosis, detectada por una reducción en la expresión del ARNm del gen antiapoptótico Bcl2 que se correlaciona con un aumento en los niveles de Cx43 (figura 2e). Además, estos resultados se confirmaron a nivel de proteína, ya que Cx43 en células MCF7 aumenta la proteína proapoptótica Bax y reduce Bcl2 (figura 2f). En conjunto, estos datos confirmaron que Cx43 induce un fenotipo similar al senescente en las células MCF7 junto con una reducción en la proliferación celular y el crecimiento tumoral.

## Ejemplo 2.3. Cx43 aumenta la eficacia de los inhibidores de CDK4/6

Para analizar si el tratamiento con el inhibidor de CDK4/6, palbociclib (palbo), aumenta los niveles de Cx43 en MCF7, se trataron las células con palbo 250 nM durante 7 días y se analizaron los niveles de proteína Cx43 mediante inmunotransferencia de tipo Western. Tal como se muestra en la figura 3a, los niveles basales de Cx43 aumentaron ligeramente en MCF7 (EV) después del tratamiento con palbo; sin embargo, este aumento fue mayor si las células MCF7 sobreexpresaban Cx43.

Basándose en los resultados obtenidos después de la sobreexpresión de Cx43 en MCF7 donde se demostró que Cx43 reduce la proliferación celular y, teniendo en cuenta que los inhibidores de CDK4/6 inducen una detención estable del ciclo celular en diferentes células cancerosas, se decidió analizar si la sobreexpresión de Cx43 también mejora la detención de la proliferación y el fenotipo similar al senescente inducidos por los inhibidores de CDK4/6. En primer lugar, ambas células MCF7 que expresaban el control vectorial (EV) y Cx43 se trataron con diferentes concentraciones del inhibidor de CDK4/6, palbociclib (PB), y se calculó la concentración inhibitoria mediana (CI50) (figura 3b). Ambas líneas de células tumorales respondieron de manera dependiente de la dosis a palbociclib, sin embargo, la CI50 de MCF7 que contenía Cx43 fue significativamente menor (66,82 nM) en comparación con aquellas células que no contienen Cx43 (282,1 nM). Para demostrar adicionalmente que Cx43 aumenta la eficacia de los inhibidores de CDK4/6, las células que expresaban el control vectorial (EV) o Cx43 se trataron durante 7 días con palbo y se analizó la proliferación celular usando un ensayo de formación de colonias. Tal como se muestra en la figura 3c, la combinación del tratamiento con Cx43 y palbo redujo la capacidad de formación de colonias de las células MCF7, demostrando un efecto sinérgico. Para ello, las células que expresaban el control vectorial (EV) o Cx43 se trataron durante 7 días con palbo y se analizó la proliferación celular mediante un ensayo de formación de colonias. Tal como se muestra en la figura 3c, la combinación del tratamiento con Cx43 y palbo redujo la capacidad de formación de colonias de las células MCF7, demostrando un efecto sinérgico. Para confirmar si la reducción de la

proliferación estuvo acompañada de un aumento de la senescencia, se analizaron los niveles de proteína del marcador de senescencia p21 junto con la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los datos obtenidos demostraron que la combinación de Cx43 y palbo aumenta los niveles de p21 (figura 3d) y  $\beta$ -galactosidasa (figura 3e) en células MCF7 después de 7 días de tratamiento. Para demostrar plenamente que la combinación de Cx43 e inhibidores de CDK4/6 podría ser una nueva estrategia terapéutica para aumentar la eficacia de estos inhibidores, se decidió analizar si el efecto obtenido con palbo se mantenía usando abemaciclib (abema) y ribociclib (ribo). El ensayo de formación de colonias demostró que Cx43 mejora el efecto de abema y ribo al reducir la proliferación celular en células MCF7 (figuras 3 f-g). Estos datos indican que Cx43 aumenta la eficacia de los inhibidores de CDK4/6 (palbo, abema, ribo) al disminuir la proliferación y aumentar la senescencia celular.

Ejemplo 2.4. La combinación de Cx43 e inhibidores de CDK4/6 potencia el efecto del fármaco senolítico navitocax

Basándose en los datos obtenidos donde se demuestra que la sobreexpresión de Cx43 inducía un fenotipo similar al senescente en células de cáncer de mama positivas para Rb, y que la combinación con inhibidores de CDK4/6 mejora el fenotipo senescente, se analizó si la combinación de Cx43 e inhibidores de CDK4/6 mejoraría el efecto del fármaco senolítico navitocax. Tal como se muestra en la figura 4a, la combinación de Cx43, el tratamiento con palbociclib y navitocax redujo la proliferación celular en comparación con la sobreexpresión de Cx43 y el tratamiento con palbociclib juntos. Para confirmar que esta reducción se debe a la eliminación de células senescentes por Cx43, las células de cáncer de mama se trataron con palbociclib durante 7 días y 24 horas con el fármaco senolítico navitocax. Se analizó Cx43 mediante inmunotransferencia de tipo Western mostrando una reducción en los niveles de proteína después del tratamiento combinado debido a la eliminación de células senescentes tumorales por Cx43 (Cx43, palbociclib, navitocax) (figura 4b). Este efecto se acompañó de una reducción en los niveles de diferentes marcadores de senescencia como la actividad  $\beta$ -galactosidasa (figura 4c) y los niveles de proteína de p21, que aumentaron con los tratamientos con inhibidores de CDK4/6 y Cx43 y disminuyeron en presencia del fármaco senolítico debido a la activación de la muerte celular de las células senescentes tumorales (figura 4b). Además, y para confirmar completamente el efecto de navitocax en células senescentes por Cx43, se analizó la proliferación usando un ensayo de formación de colonias después de 14 días de tratamiento (figura 4d), demostrando que la reducción de la proliferación es mayor en presencia de Cx43. De hecho, la combinación triple (figura 4d) de Cx43, palbociclib y navitocax redujo significativamente la proliferación en células de cáncer de mama en comparación con palbo y navitocax solos, probablemente debido a la eliminación de células senescentes positivas para Cx43 por la activación de la muerte celular programada por apoptosis. Curiosamente, y acorde con los resultados observados anteriormente (figura 4a), el tratamiento durante 14 días reveló que la inducción de senescencia por Cx43 conduce a un aumento de la eficacia de navitocax (en presencia de Cx43) (figura 4d), lo que indica que Cx43 en tratamientos a largo plazo aumenta adicionalmente la senescencia de las células tumorales e incluso puede dar como resultado un tratamiento más efectivo en comparación con el tratamiento con inhibidores de CDK4/6 solos. Sin embargo, la mejor estrategia terapéutica dio como resultado la combinación triple de inhibidores de CDK4/6, Cx43 y navitocax.

Ejemplo 2.5. Cx43 aumenta la eficacia de los inhibidores de CDK4/6 en otros tipos de tumores

Para explorar si Cx43 aumenta la eficacia de los inhibidores de CDK4/6 en otros tipos de tumores, se aprovecharon las células de melanoma A375 y la línea celular de adenocarcinoma de colon HT29. Las células (A375 y HT29) se transfectaron con un plásmido para sobreexpresar Cx43. Los niveles de proteínas Rb y Cx43 se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western (figuras 5a y 5c). Tal como se muestra en la figura 5b y la figura 5d, la sobreexpresión de Cx43 aumenta la eficacia de palbociclib, abemaciclib y ribociclib en líneas celulares de melanoma y adenocarcinoma de colon, demostrado por una reducción en la proliferación después de 7 días de tratamiento.

Ejemplo 2.6. Las sEV que contienen altos niveles de Cx43 tienen actividad antitumoral y mejoran la eficacia de CDK4/6i

Para estudiar adicionalmente el efecto de Cx43, se han usado vesículas extracelulares pequeñas (sEV) como vehículo para administrar esta proteína a las células diana. Las sEV se aislaron de la línea celular HEK 293 que contiene niveles muy altos de Cx43 (figura 6a). Las sEV se caracterizaron usando análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) (figura 6b) y también se analizó la internalización de sEV en las células diana MCF7 (figura 6c). Para los experimentos de internalización, las sEV se marcaron con DilC durante 30 minutos y se incubaron con células tumorales durante la noche. Las sEV positivas para Cx43 (sEV-Cx43+) tienen un efecto antiproliferativo en células MCF7 tratadas con sEV derivadas de HEK293T (figura 6d), que contienen altos niveles de Cx43 tal como se mostró anteriormente. Para confirmar que las sEV positivas para Cx43 tienen un efecto antiproliferativo, las células MCF7 se trataron con sEV derivadas de HEK-293 (figura 6b). Tal como se muestra en la figura, se observa una reducción en la capacidad de formación de colonias y un aumento en la eficacia del tratamiento con inhibidores de CDK4/6, cuando las células se trataron conjuntamente con sEV positivas para Cx43 y con inhibidores de CDK4/6 durante 7 días. Estos resultados demuestran que la Cx43 dentro de las sEV da como resultado una estrategia terapéutica eficaz para reducir la proliferación celular y aumenta la eficacia del tratamiento con inhibidores de CDK4/6. Además, se aislaron sEV de células MCF7 que expresan Cx43 y de células que contienen el control vacío (EV). Sólo se detectó Cx43 en sEV liberadas por células tumorales que sobreexpresan la proteína (MCF7-Cx43) (figura 6e). No pudieron encontrarse diferencias significativas en el número de partículas secretadas, en el tamaño (figura 6f) o internalización (figura 6g) al comparar sEV de células con EV y Cx43 restablecida. Sin embargo, cuando

las células MCF7 se trataron con sEV aisladas de células con EV y Cx43 restablecida, las sEV que contenían Cx43 pudieron inducir una detención de la proliferación en las células diana (figura 6h), demostrando el efecto de Cx43 como una nueva estrategia terapéutica.

5 Ejemplo 2.7. Los niveles de Cx43 están asociados con la respuesta a los inhibidores de CDK4/6

Para confirmar completamente que Cx43 mejora la eficacia de los inhibidores de CDK4/6 en células HR+/HER2-, se aprovechó una línea celular de cáncer de mama positiva para Rb diferente del mismo subtipo (T47D). En primer lugar, se analizaron los niveles de proteína Cx43 mediante inmunotransferencia de tipo Western (figura 7a) y se encontró que las células T47D contienen Cx43, aunque los niveles son más bajos en comparación con las células restablecidas MCF7 (MCF7-Cx43) (figura 7a). Estos resultados se confirmaron mediante inmunofluorescencia (figura 7b). A continuación, se trató T47D con concentraciones crecientes del inhibidor de CDK4/6, palbociclib, y tal como se muestra en la figura 3c, esta línea celular respondió al inhibidor de manera dependiente de la dosis, con una CI50 de 120,6 nM. En conjunto, los presentes datos indican que los niveles de proteína Cx43 se correlacionan con la respuesta a palbociclib en ambas células tumorales (MCF7 y T47D) y se observó que niveles más altos de Cx43 se correlacionan con una CI50 más baja de palbociclib, lo que confirma que Cx43 aumenta la eficacia de los inhibidores de CDK4/6, tales como palbociclib (figura 7d). Tras estos hallazgos, se realizó un ensayo de formación de colonias para demostrar que T47D responde eficazmente a los 3 inhibidores de CDK4/6, palbociclib, abemaciclib y ribociclib después de 7 días de tratamiento (figura 4e). Se sometió a prueba el efecto de palbociclib en la inducción de un fenotipo senescente en células T47D usando qPCR e inmunofluorescencia. Las células se trataron con palbo durante 7 días y se analizaron los niveles de diferentes marcadores de senescencia junto con la expresión de Cx43. El análisis de la expresión génica reveló una regulación por incremento de Cx43 y de los factores de senescencia p21 y factores de SASP (IL6, IL8 y MMP9) tras el tratamiento con fármaco (figura 7f). Además, los estudios de inmunofluorescencia mostraron un aumento en los niveles de proteína Cx43 cuando estas células son sensibles al tratamiento (figura 7g).

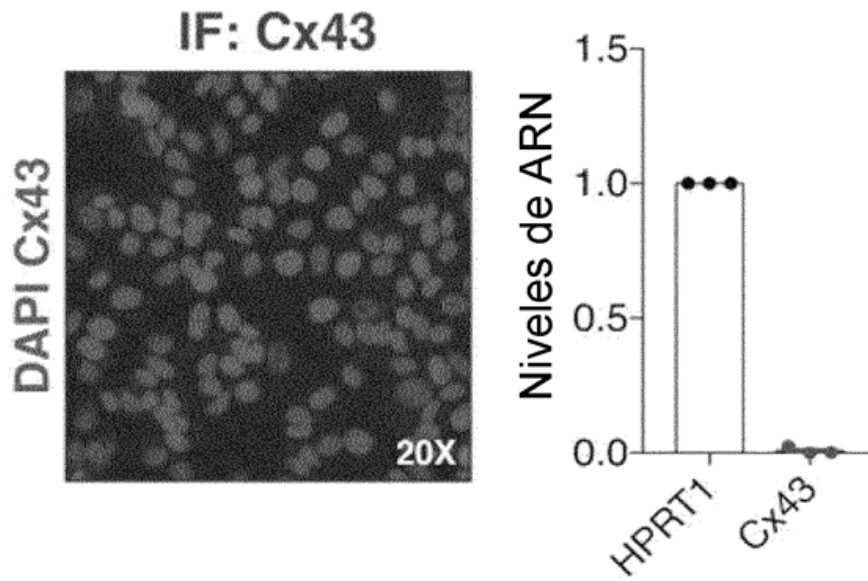
Para confirmar el efecto de Cx43 en combinación con inhibidores de CDK4/6 en la línea celular T47D, se usaron vesículas extracelulares pequeñas (sEV) como vehículo para administrar esta proteína a las células diana. Las sEV se aislaron de la línea celular HEK293T que contiene niveles muy altos de Cx43 (figura 6a). Tal como se muestra en la figura 7h, se observa una reducción significativa en la capacidad de formación de colonias cuando las células diana se trataron en combinación con sEVs-Cx43+ e inhibidores de CDK4/6, lo que confirma que Cx43 exosomal aumenta la eficacia de los inhibidores de CDK4/6 en células de cáncer de mama HR+/HER2-.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Conexina 43 para su uso en el tratamiento de cáncer antes, después o simultáneamente a un tratamiento con un inhibidor de CDK4/6, en donde el cáncer está caracterizado por la presencia de un gen de retinoblastoma (RB) funcional.
- 10 2. Conexina 43 para su uso en el tratamiento de cáncer, según la reivindicación 1, antes, después o simultáneamente a un tratamiento con un inhibidor de CDK4/6 seleccionado de: abemaciclib, palbociclib y/o ribociclib.
- 15 3. Conexina 43 para su uso en el tratamiento de cáncer, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, antes, después o simultáneamente a un tratamiento con el inhibidor de CDK4/6, palbociclib.
- 20 4. Conexina 43 para su uso en el tratamiento de cáncer, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, antes, después o simultáneamente a un tratamiento con un agente senolítico, preferiblemente navitoclax.
- 25 5. Conexina 43 para su uso en el tratamiento de cáncer, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cáncer está caracterizado además por hiperactividad de CDK4 y CDK6.
- 30 6. Conexina 43 para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el tratamiento de un tipo de cáncer seleccionado de la lista que comprende: cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células escamosas, tumor neuroendocrino pancreático, oligodendroglioma y oligoastrocitoma.
- 35 7. Medicamento de combinación que comprende conexina 43 y un inhibidor de CDK4/6.
- 40 8. Medicamento de combinación, según la reivindicación 7, que comprende conexina 43 y un inhibidor de CDK4/6 seleccionado de: abemaciclib, palbociclib y/o ribociclib.
- 45 9. Medicamento de combinación, según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, que comprende conexina 43 y el inhibidor de CDK4/6, palbociclib.
- 50 10. Medicamento de combinación, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la conexina 43 puede seleccionarse de proteína conexina 43 o de ARNm de conexina 43.
- 55 11. Medicamento de combinación, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que comprende además un agente senolítico, preferiblemente navitoclax.
12. Composición farmacéutica que comprende el medicamento de combinación según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 y, opcionalmente, excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.
13. Composición farmacéutica, según la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento de cáncer, en donde el cáncer es positivo para la proteína de retinoblastoma.
14. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 13, en donde el cáncer está caracterizado además por hiperactividad de CDK4 y CDK6.
15. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 13 ó 14, en donde la conexina 43 se administra mediante el uso de un vehículo de administración.
16. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 15, en donde el vehículo de administración es una nanopartícula, una vesícula, una vesícula extracelular, un vector de expresión o una molécula de ADN o ARN.
17. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 16, en donde el vector de expresión codifica para el ARNm de conexina 43 que a su vez se traduce en la proteína conexina 43.

Figura 1

**a**



**b**

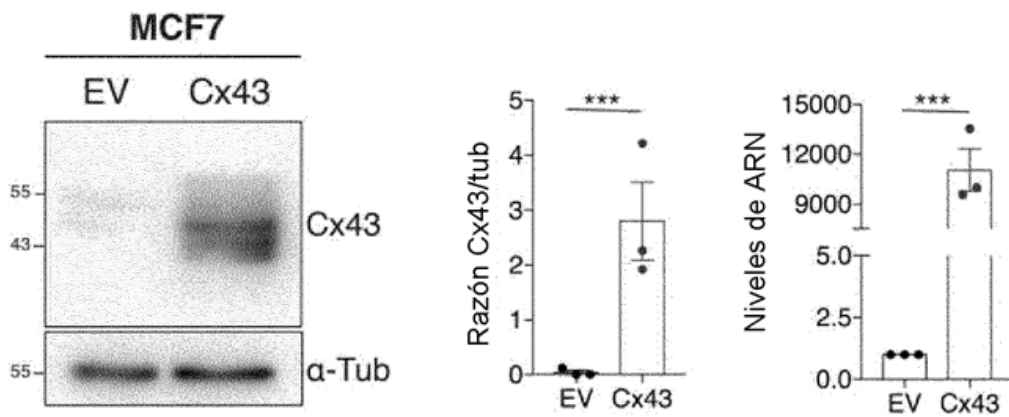
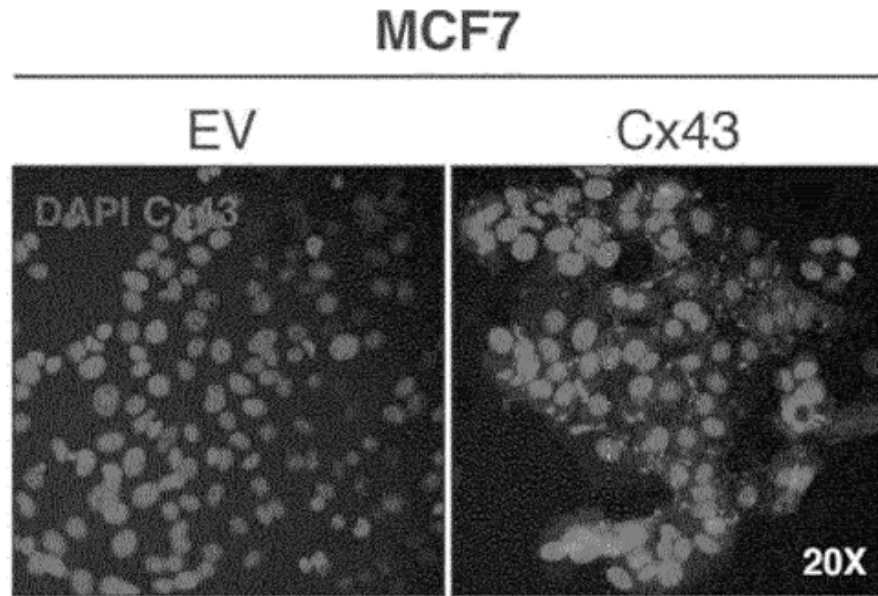


Figura 1 (cont.)

**C**



**d**

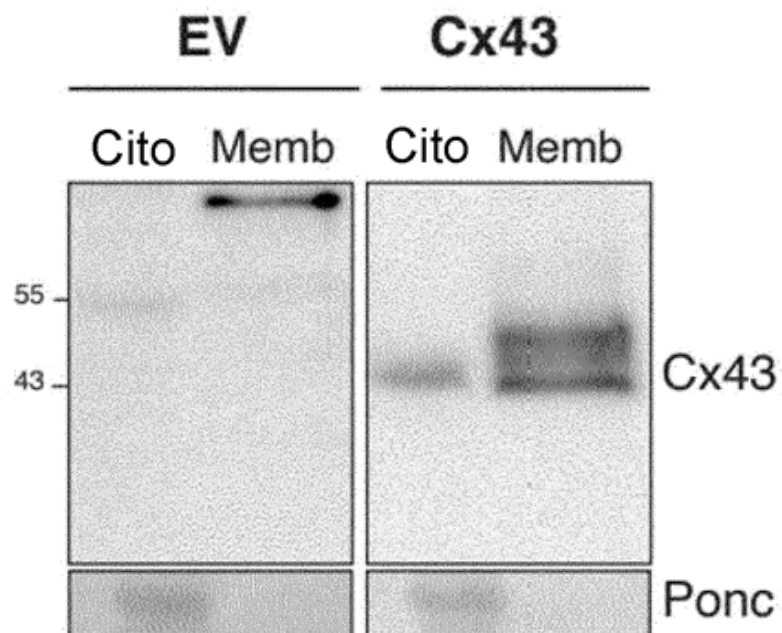
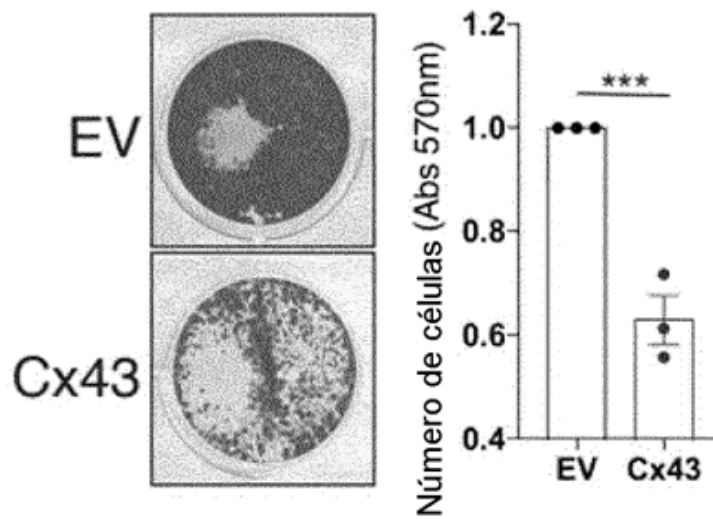


Figura 1 (cont.)

**e**

**Proliferación a los 7 días**



**f**

**Actividad de hemicanales**

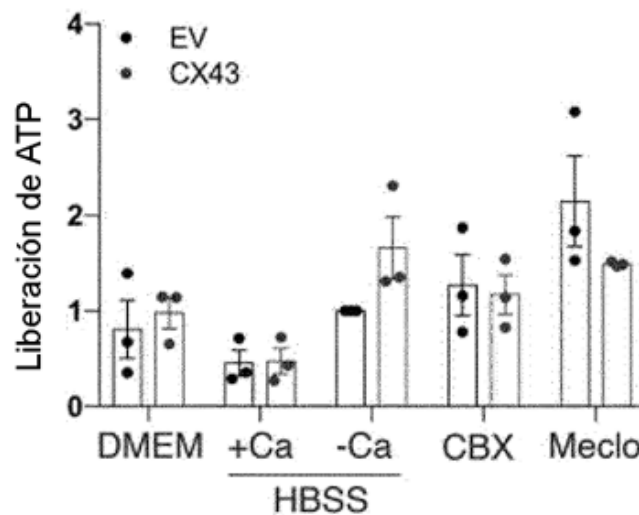


Figura 1 (cont.)

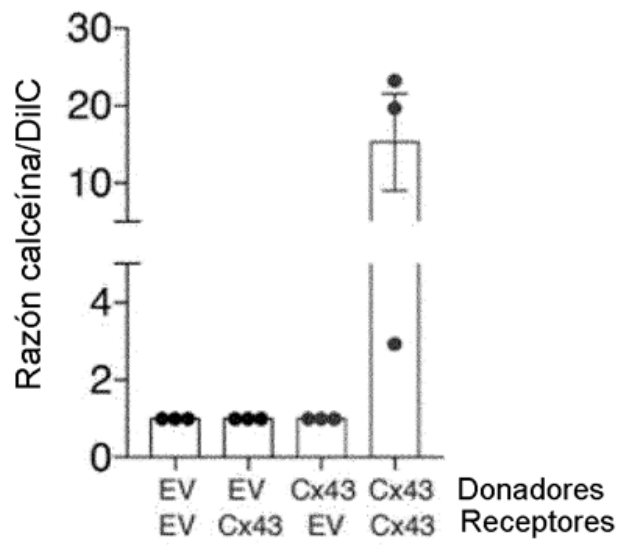
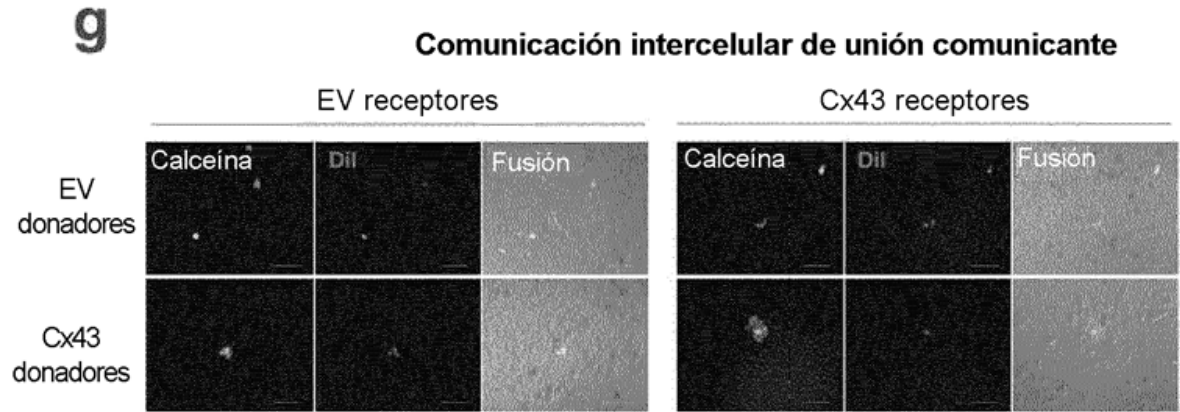
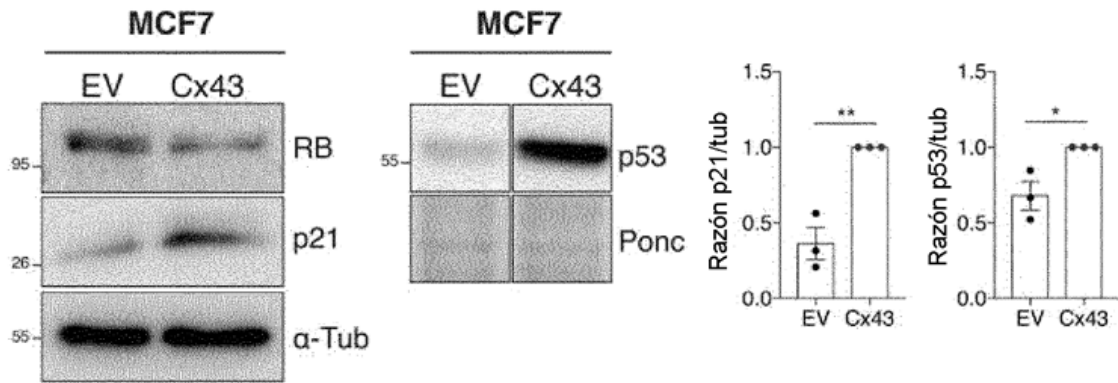


Figura 2

**a**



**b**

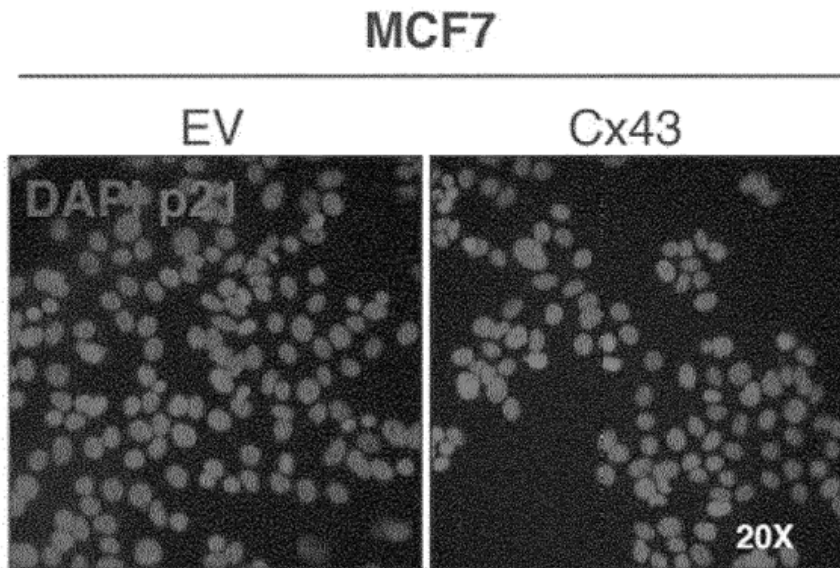
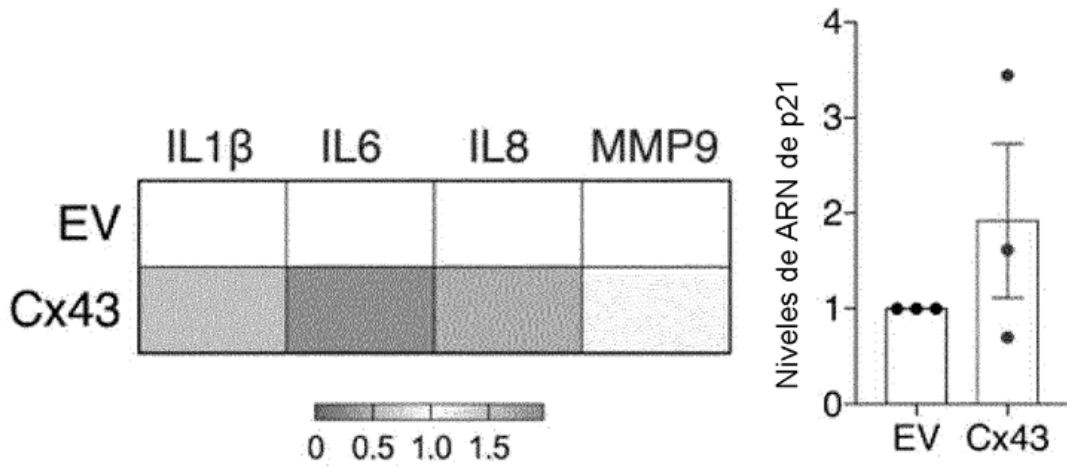


Figura 2 (cont.)

**C**

**Niveles de ARNm de SASP**



**d**

**SA- $\beta$ -Galactosidasa**

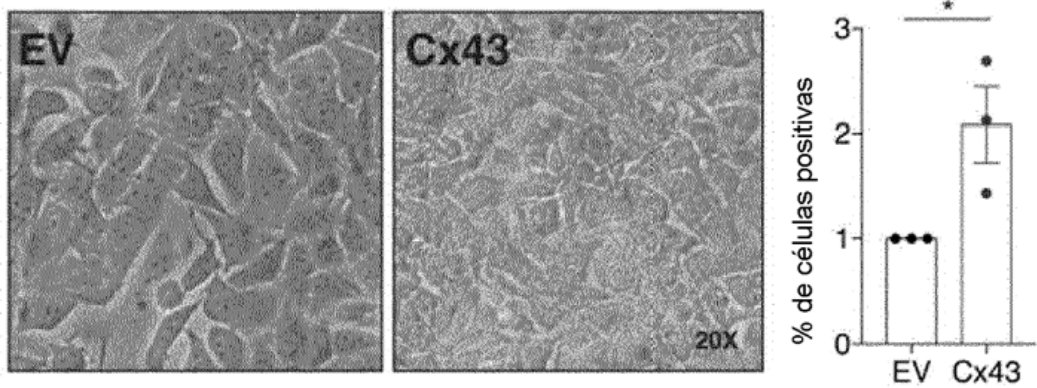
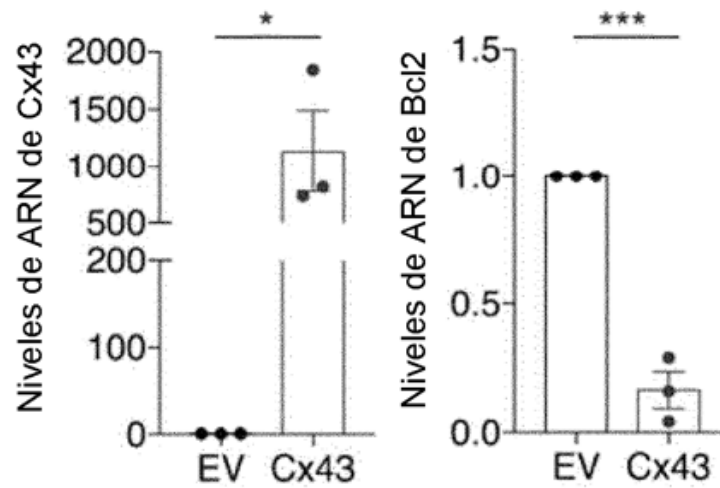


Figura 2 (cont.)

**e**



**f**

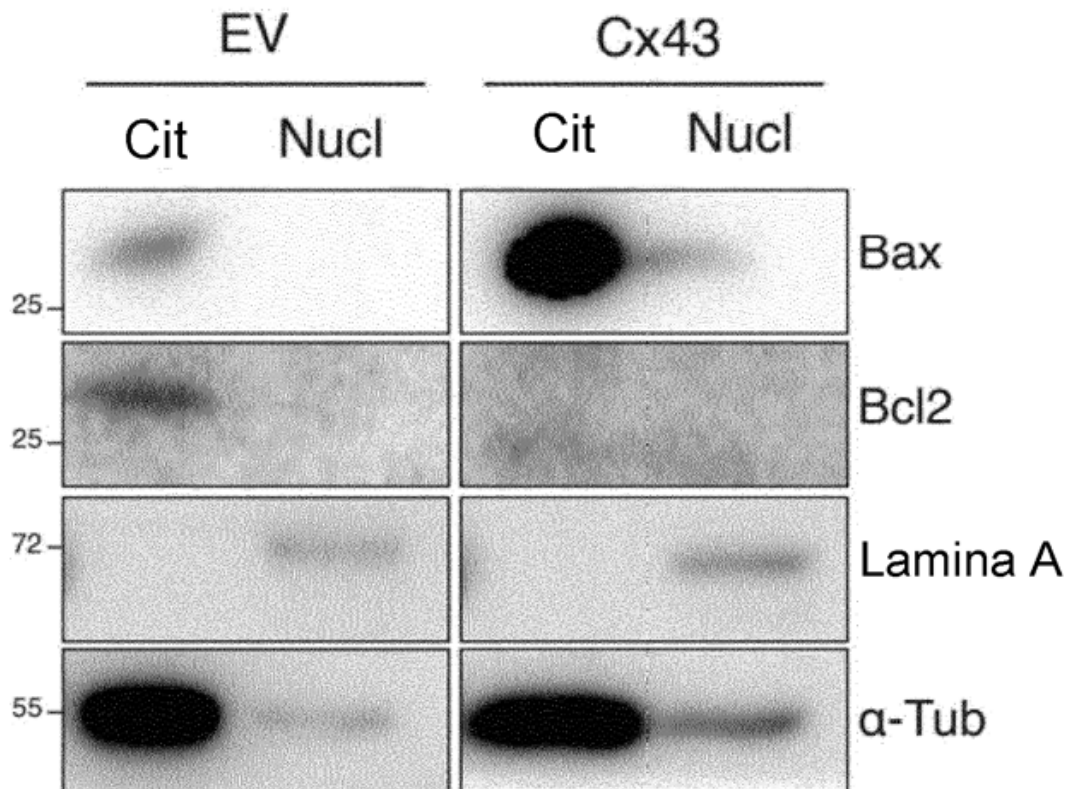


Figura 3

**a**

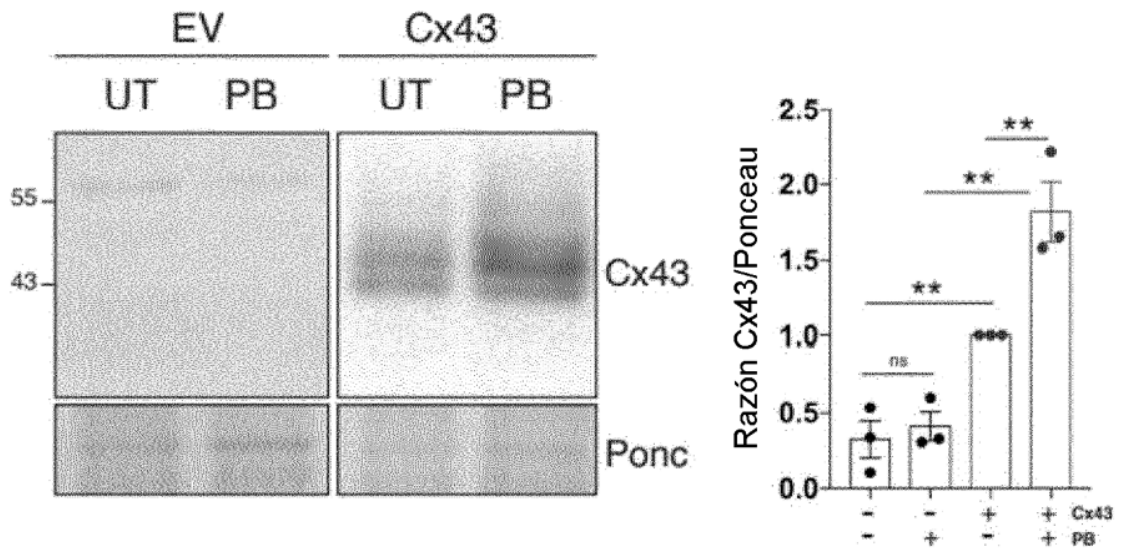


Figura 3 (cont.)

**b**

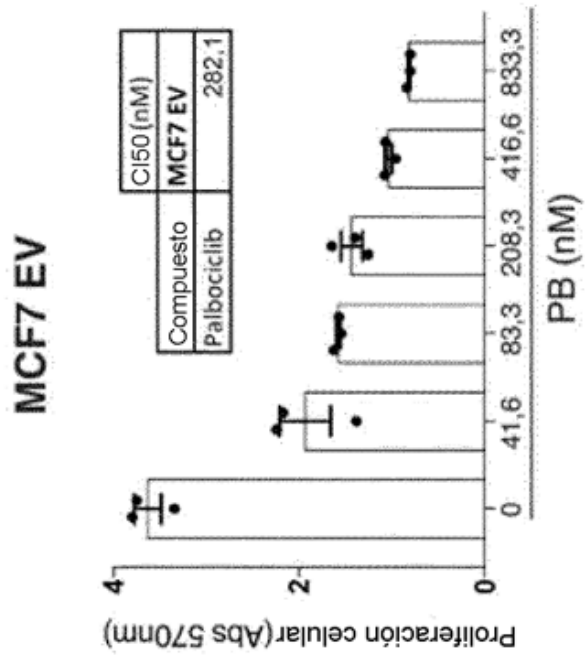
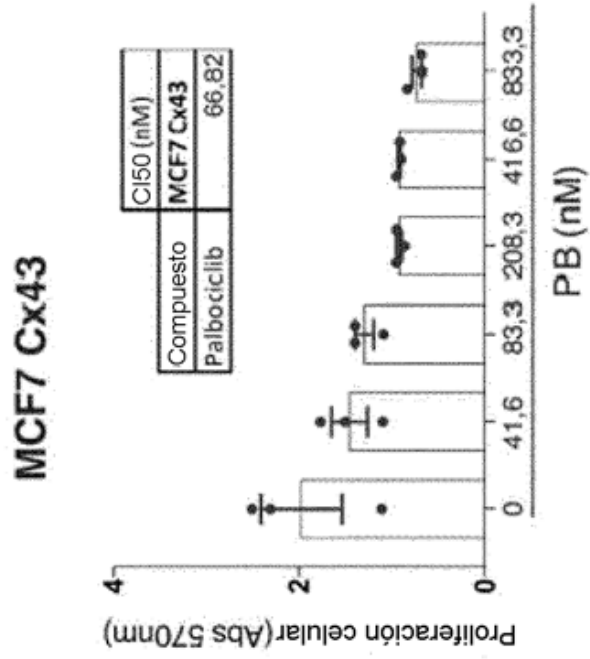
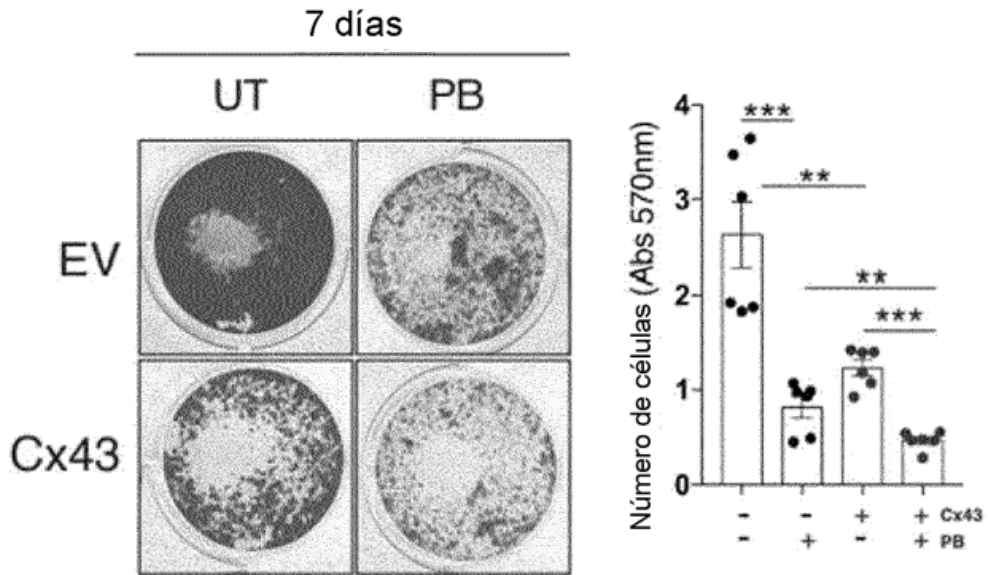


Figura 3 (cont.)

**C**



**d**

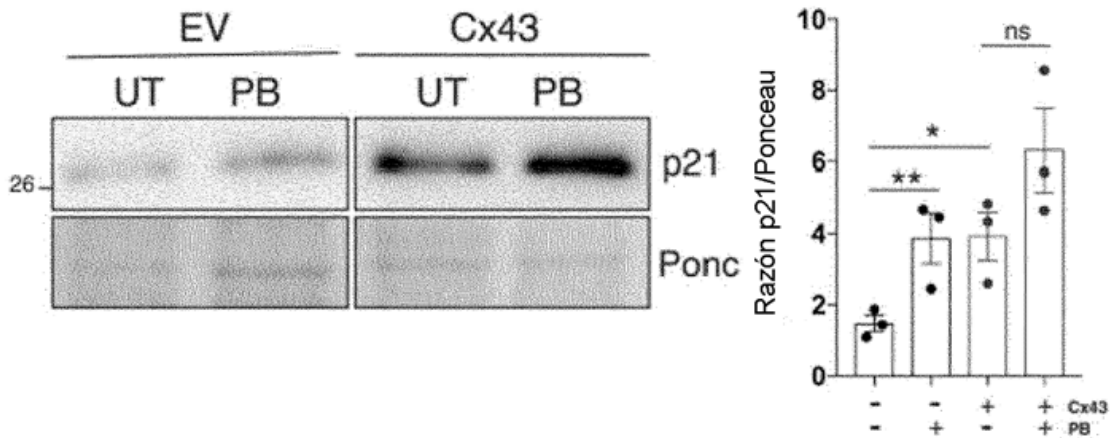
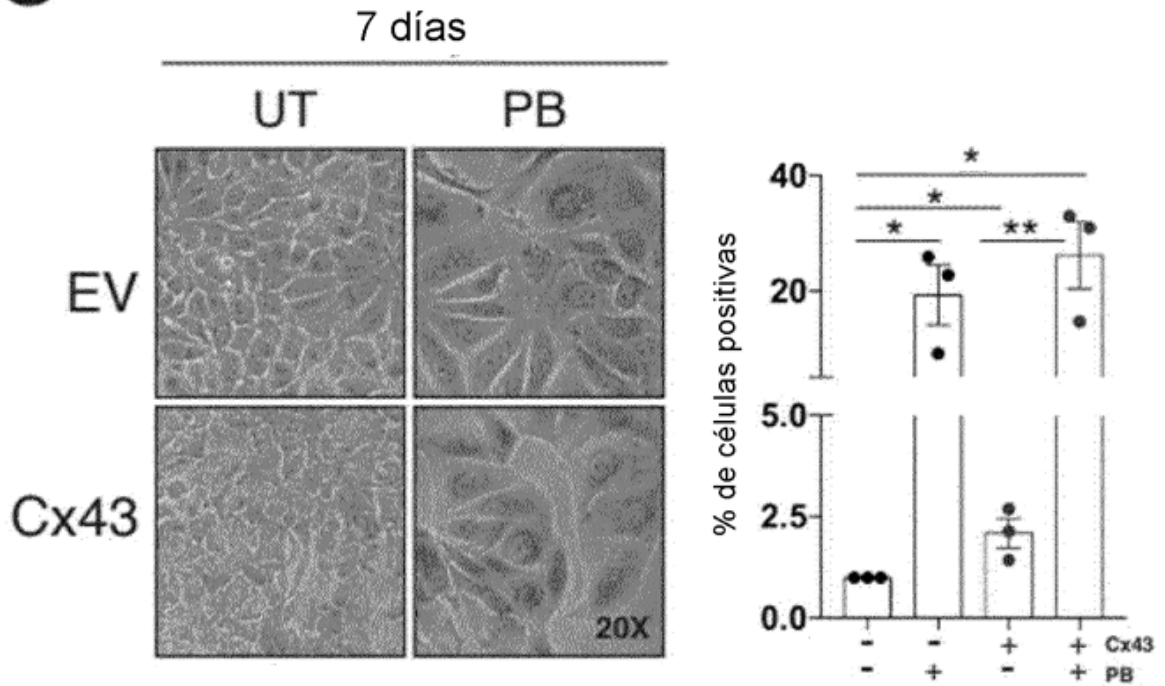


Figura 3 (cont.)

**e**



**f**

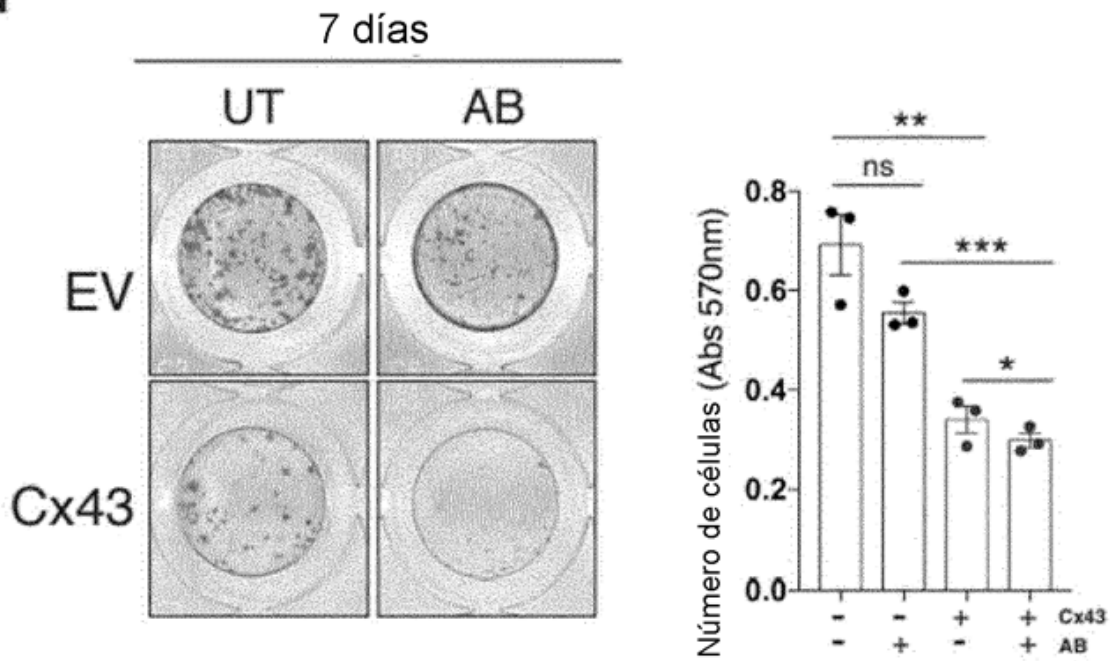


Figura 3 (cont.)

**g**

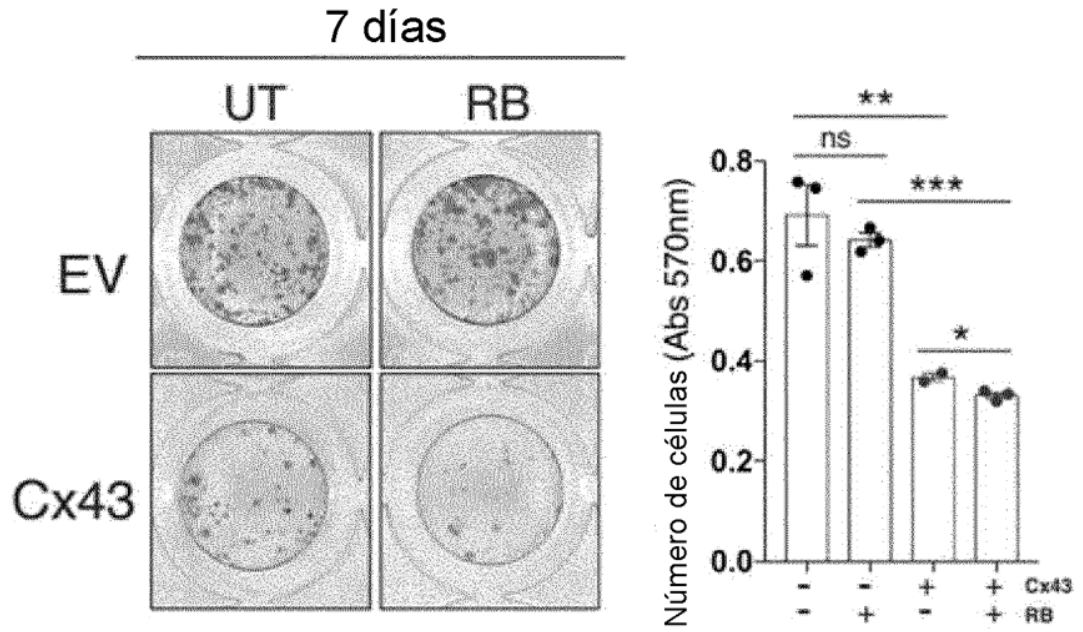


Figura 4

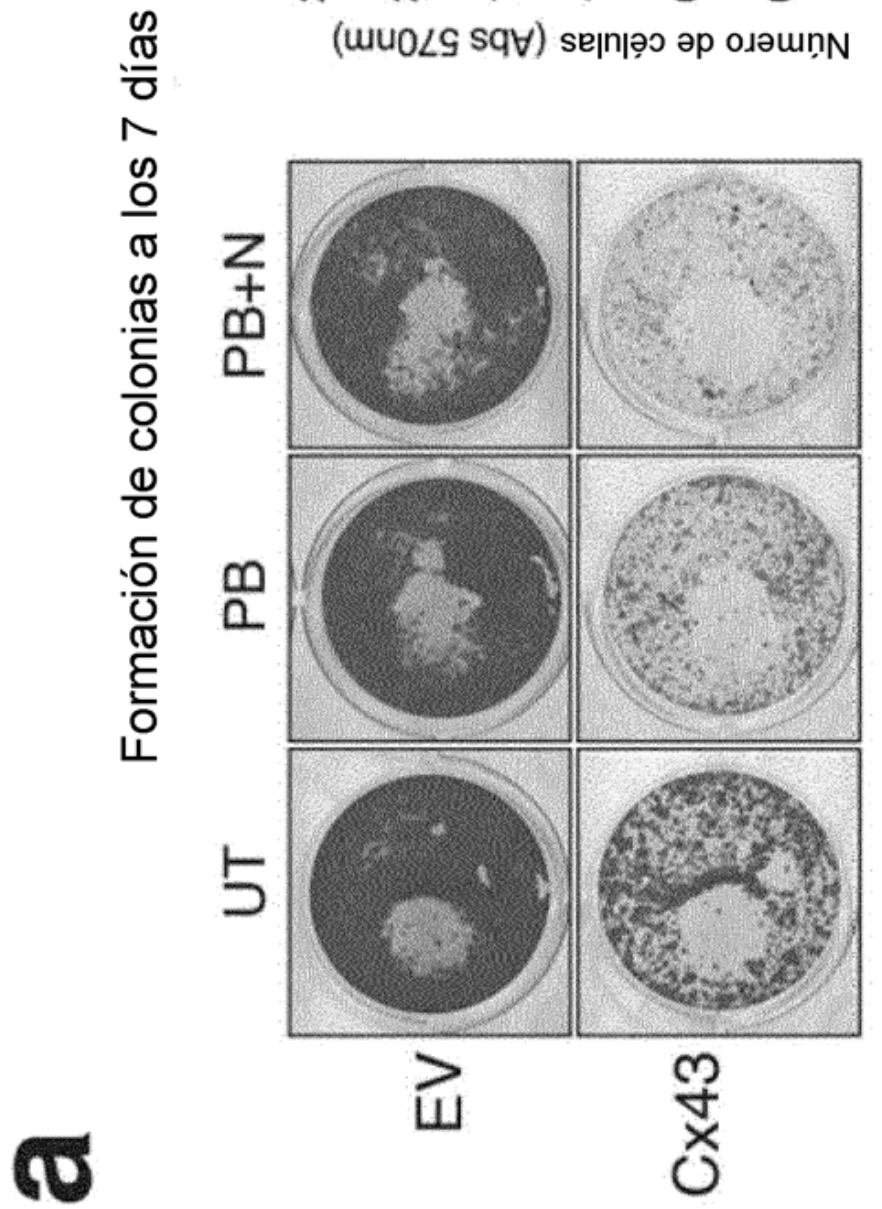


Figura 4 (cont.)

**b**

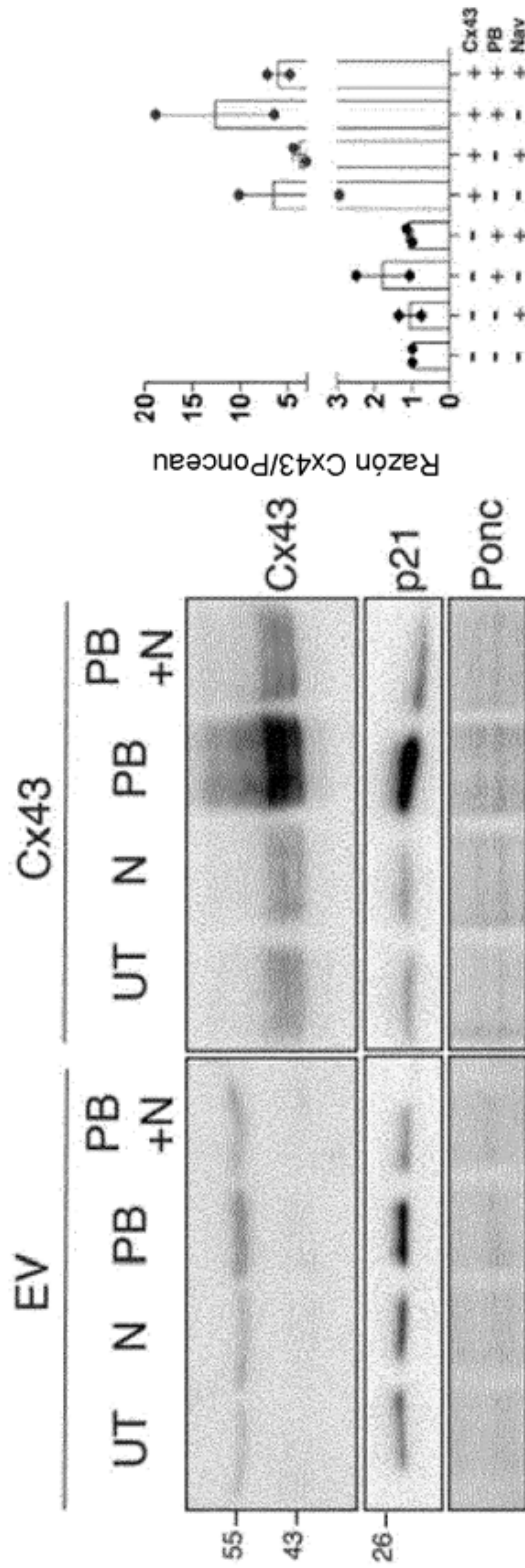


Figura 4 (cont.)

**C** SA- $\beta$ -galactosidasa a los 14 días

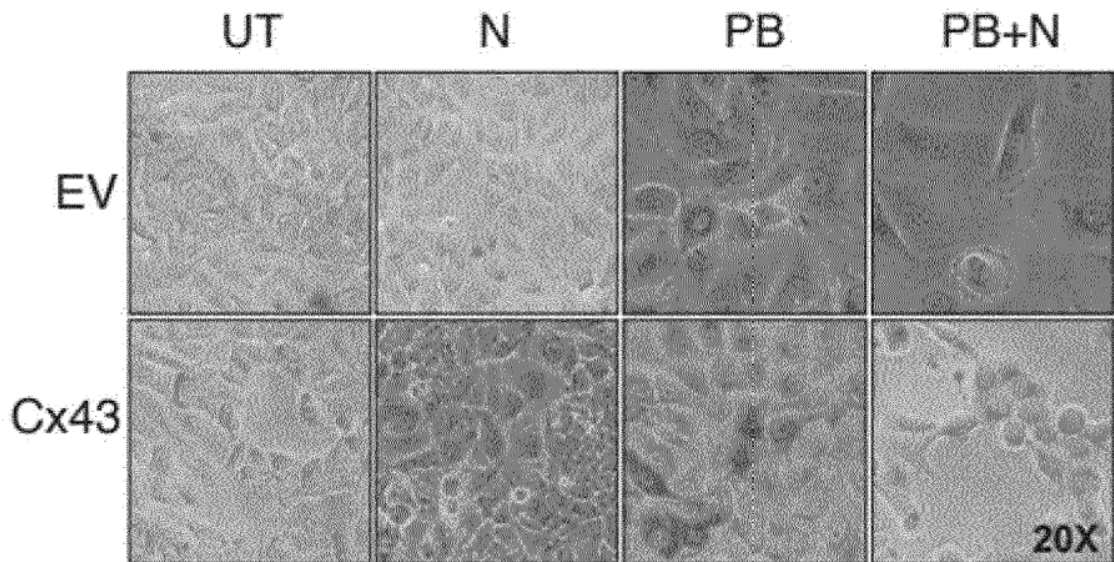


Figura 4 (cont.)

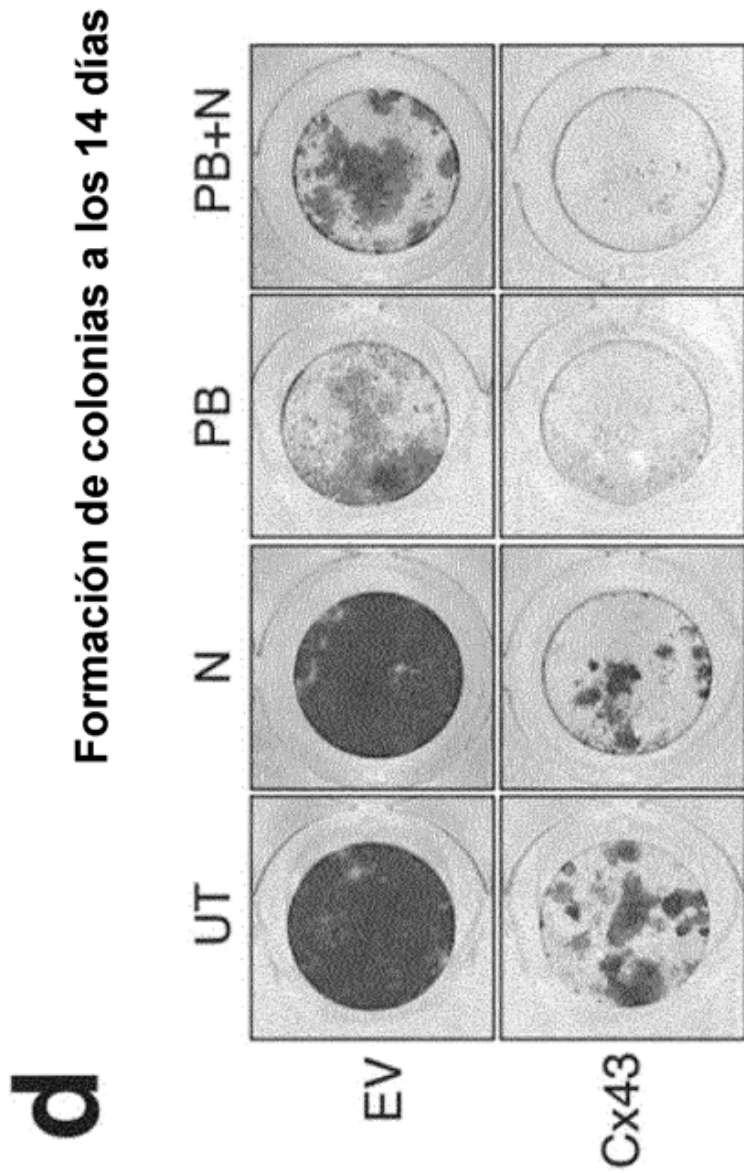


Figura 5

**a**

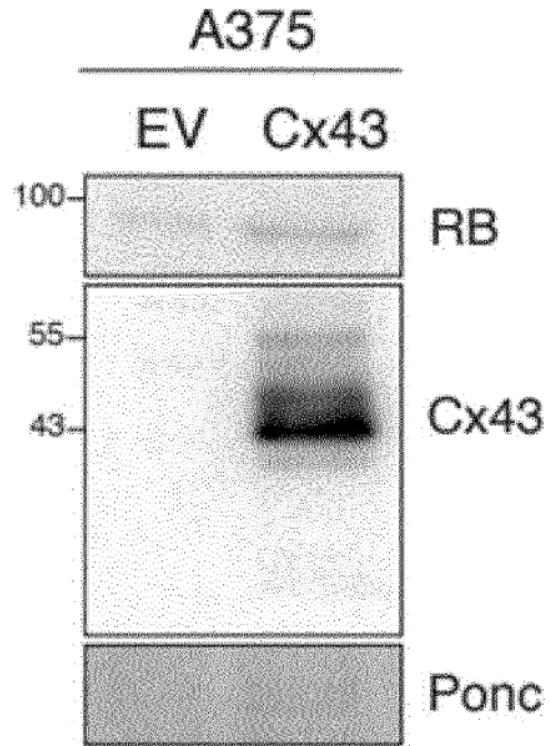


Figura 5 (cont.)

**b**

A375 a los 7 días

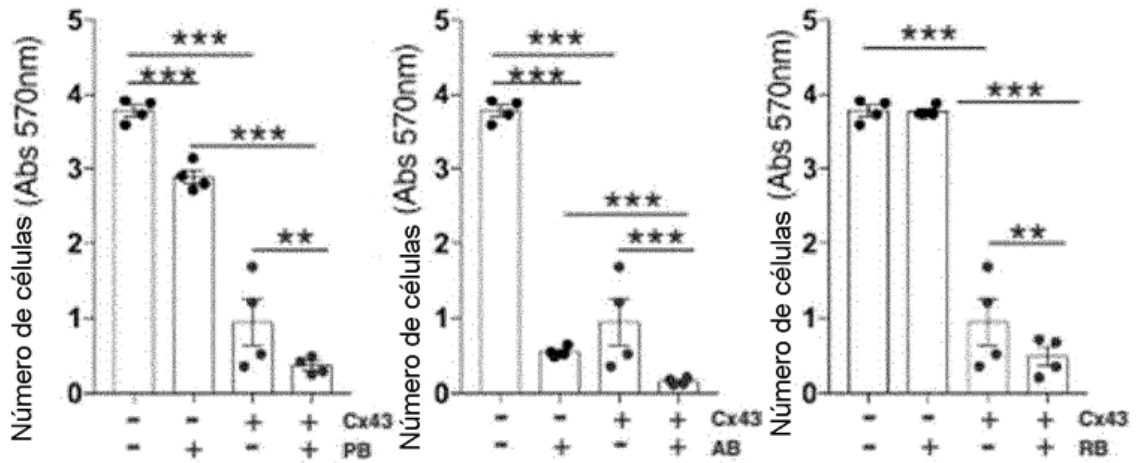
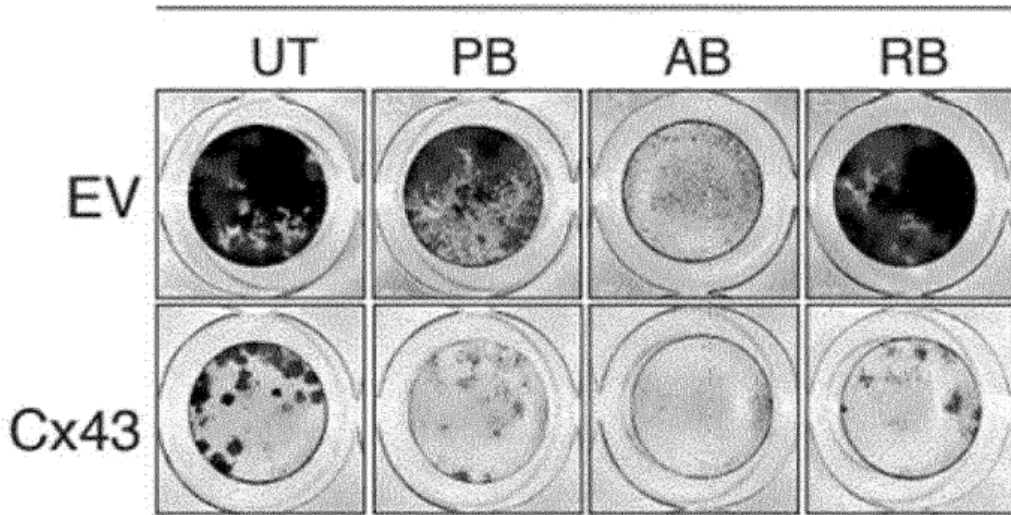


Figura 5 (cont.)

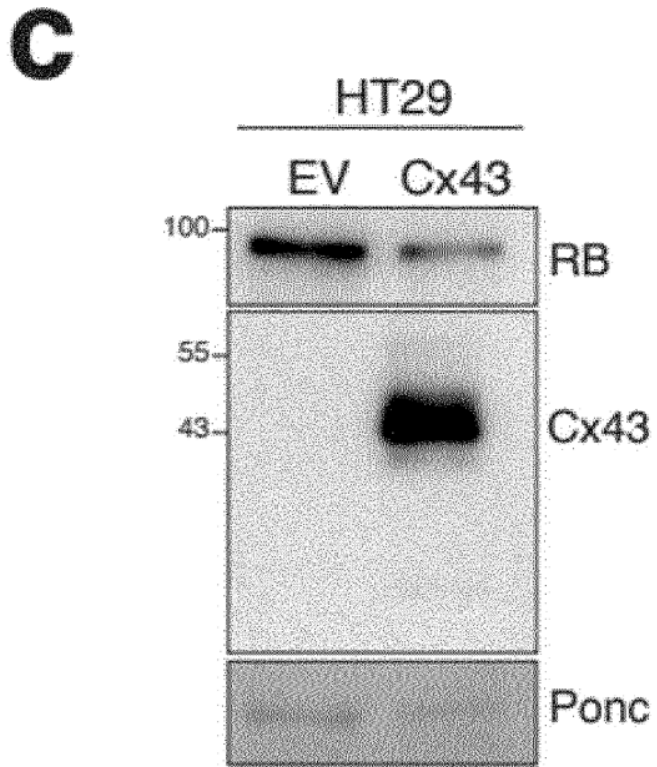


Figura 5 (cont.)

**d**

HT29 a los 7 días

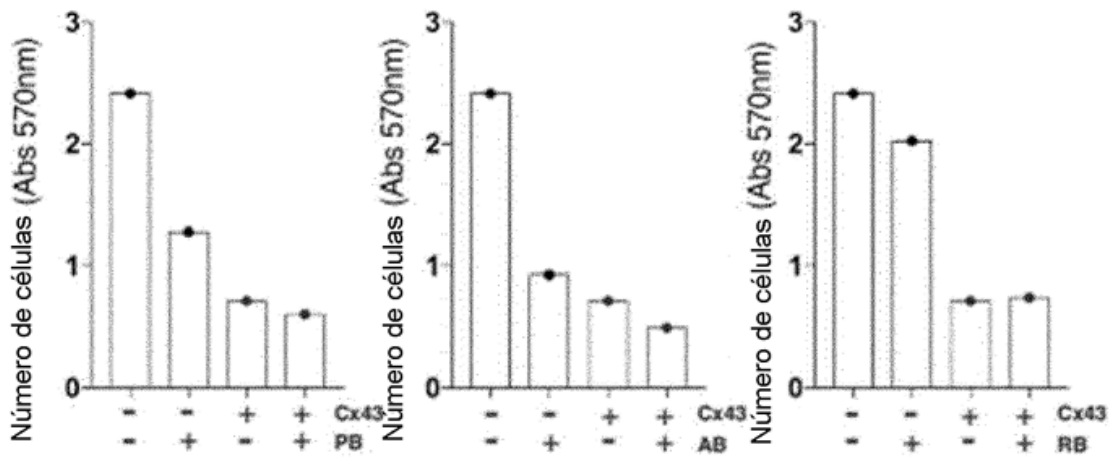
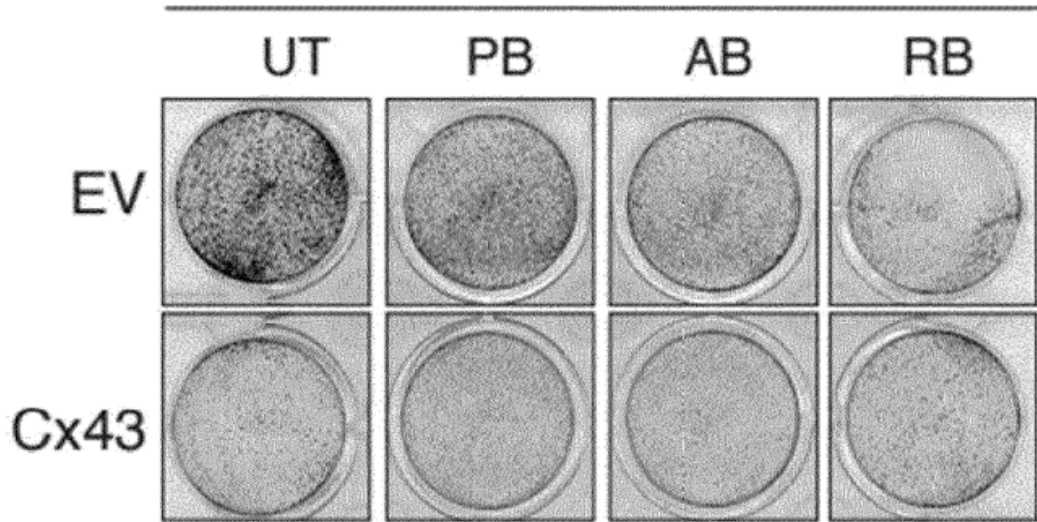
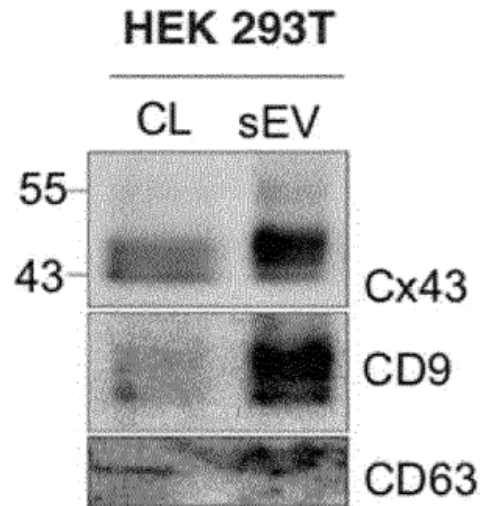


Figura 6

**a**



**b**

**Caracterización por NTA**

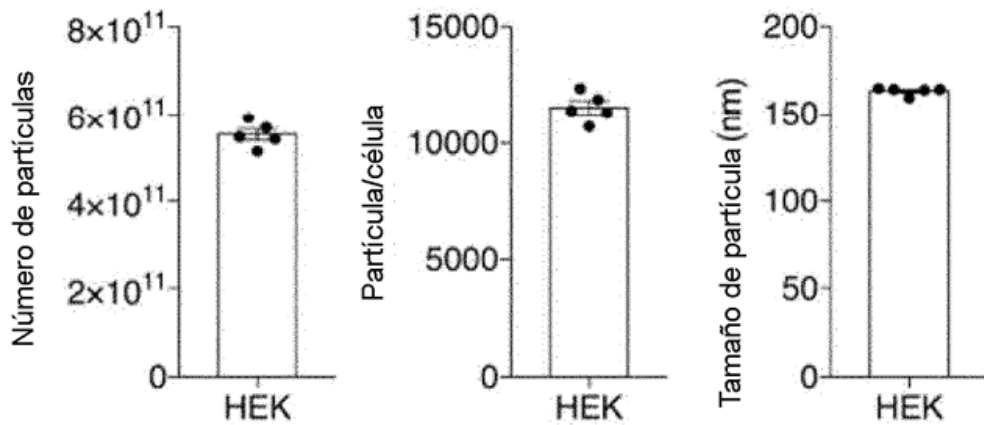


Figura 6 (cont.)

**C**

**Células diana MCF7**

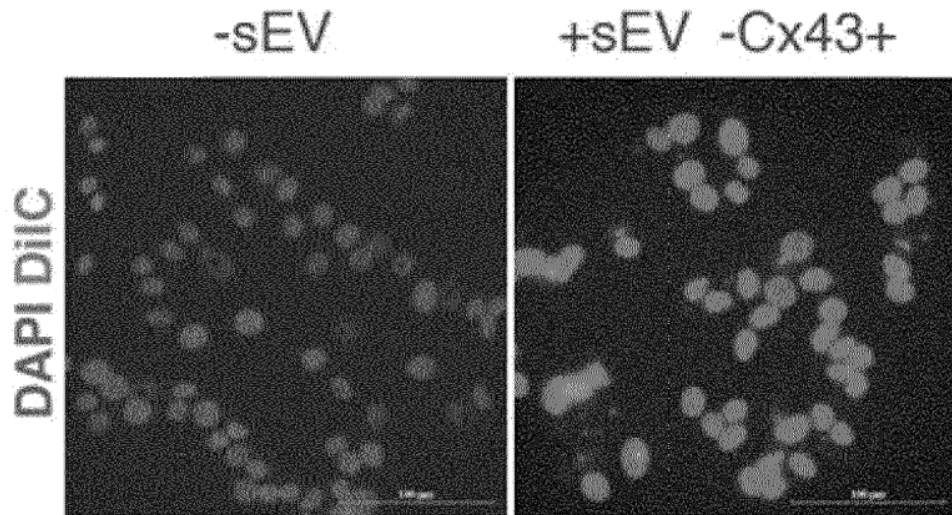
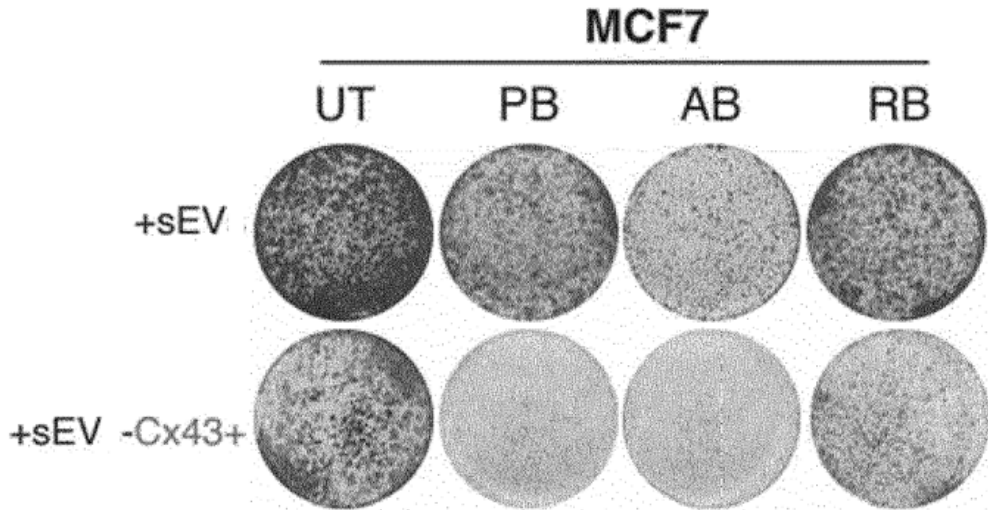


Figura 6 (cont.)

**d**



**Formación de colonias a los 7 días**

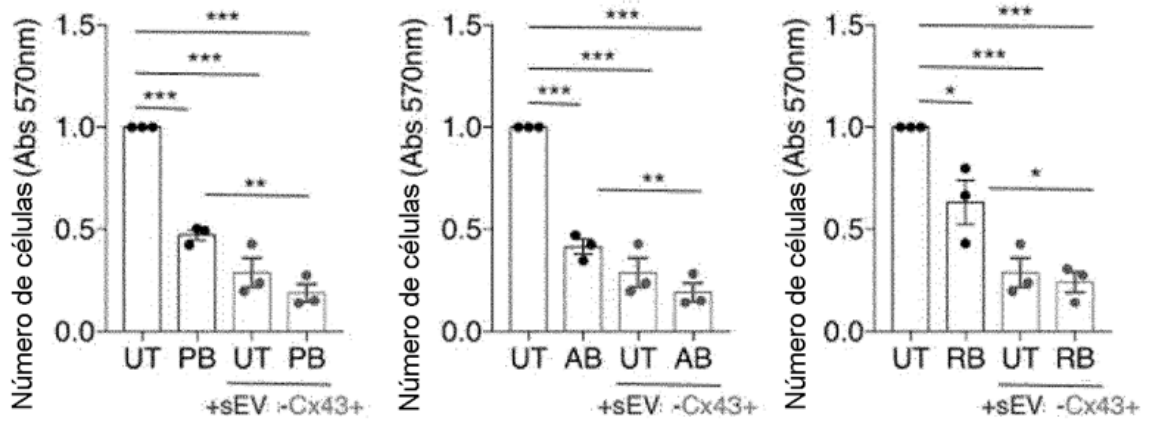
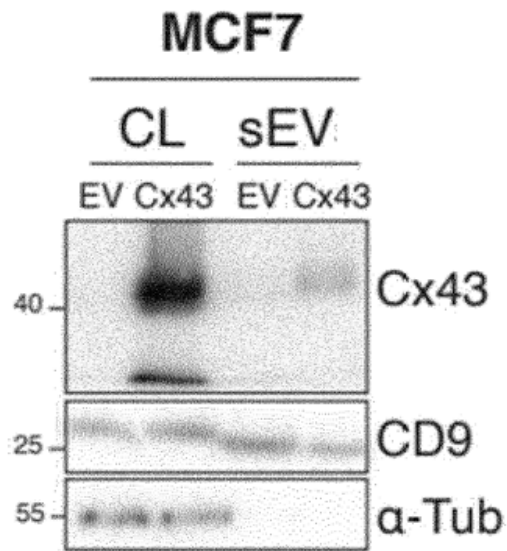


Figura 6 (cont.)

**e**



**f**

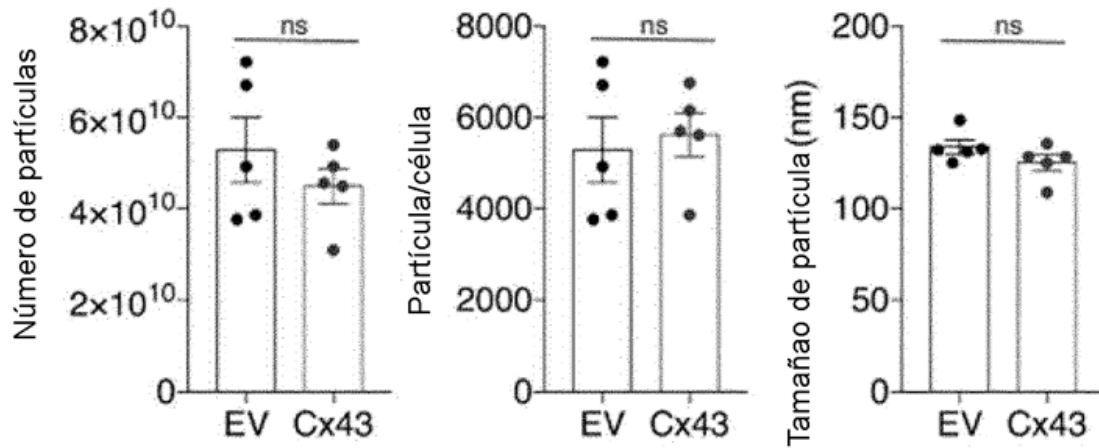


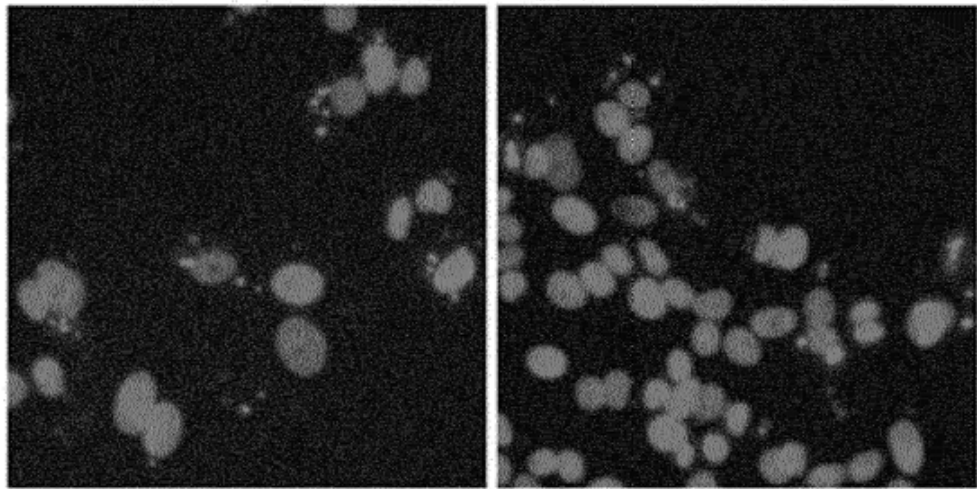
Figura 6 (cont.)

**g**

**Células diana MCF7**

+sEV    -EV                    +sEV    -Cx43

DAPI DiIC



**h**

**MCF7**

+sEV    -EV                    +sEV    -Cx43

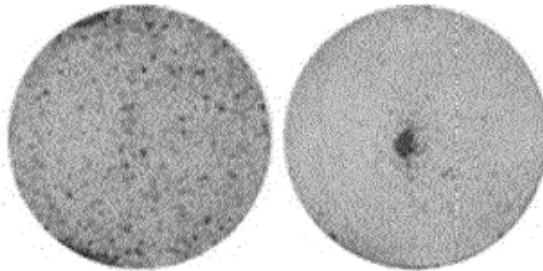


Figura 7

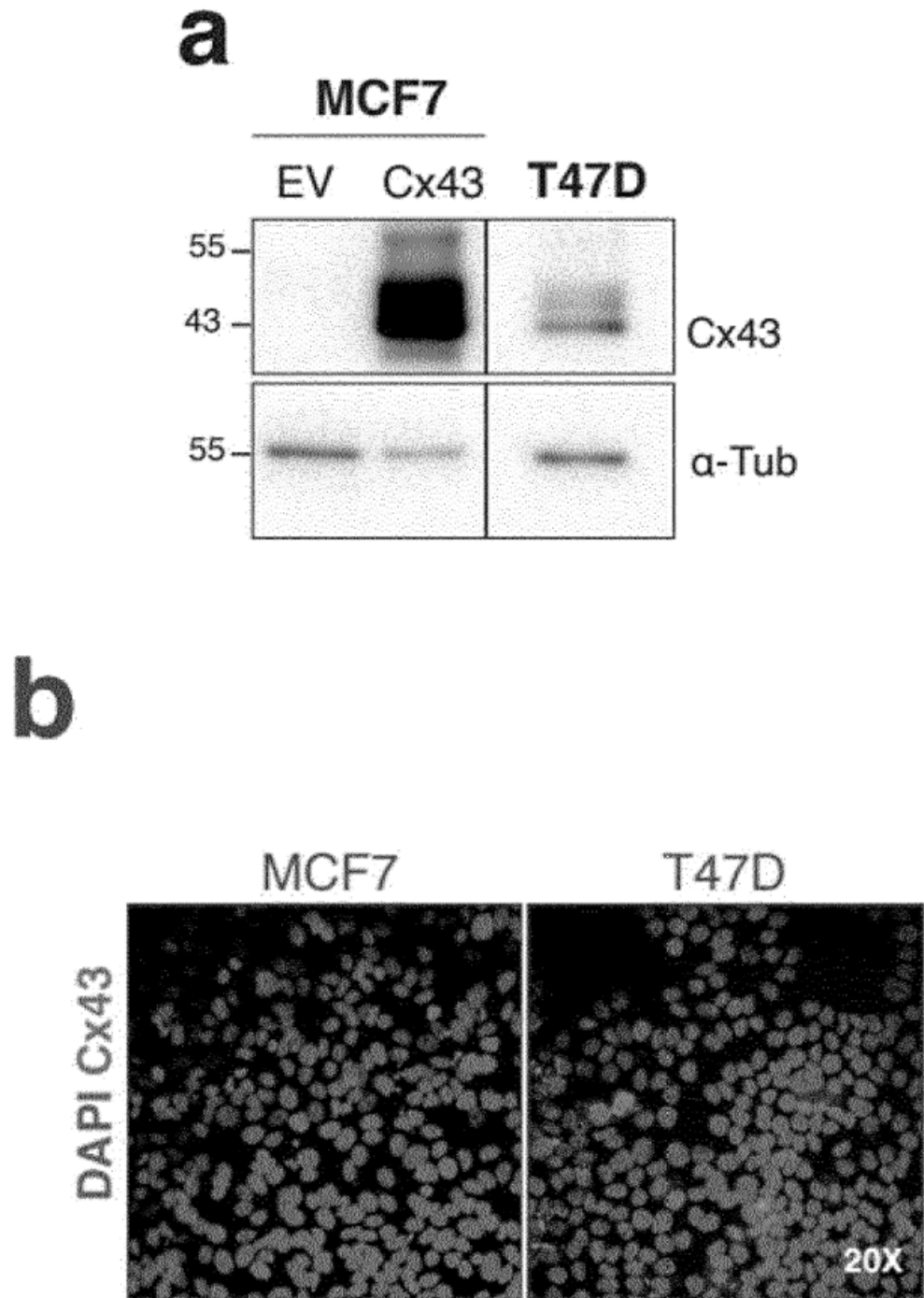
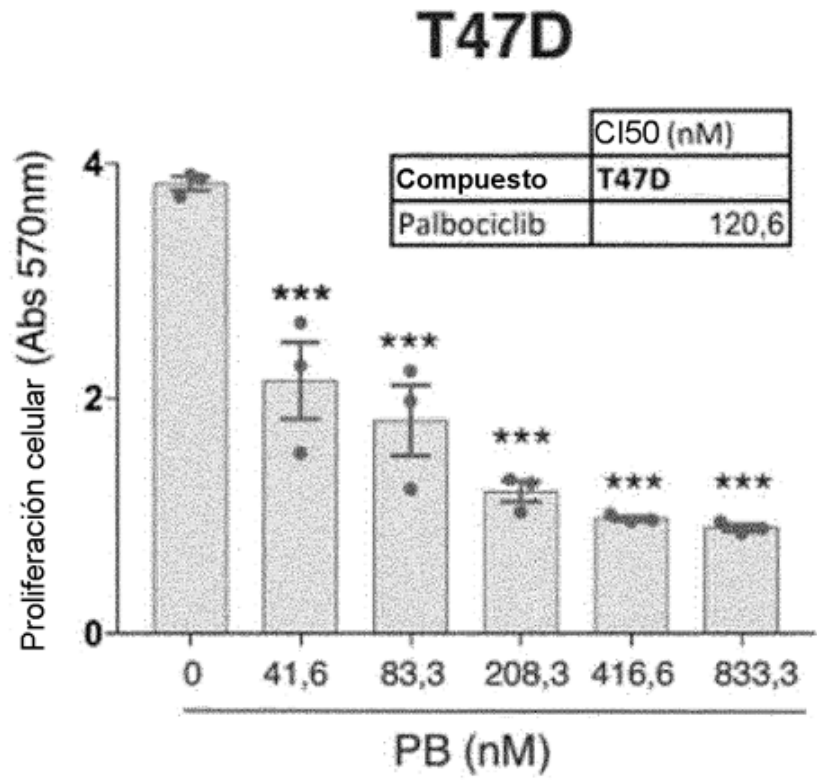


Figura 7 (cont.)

**C**



**d**

**Niveles de Cx43 y  
respuesta a palbo**

Línea celular	Cx43 (niveles de proteína)	CI50 Palbo (nM)
MCF7 EV	0	282,1
T47D	1,8809	120,6
MCF7 Cx43	7,3290	66,82

Figura 7 (cont.)

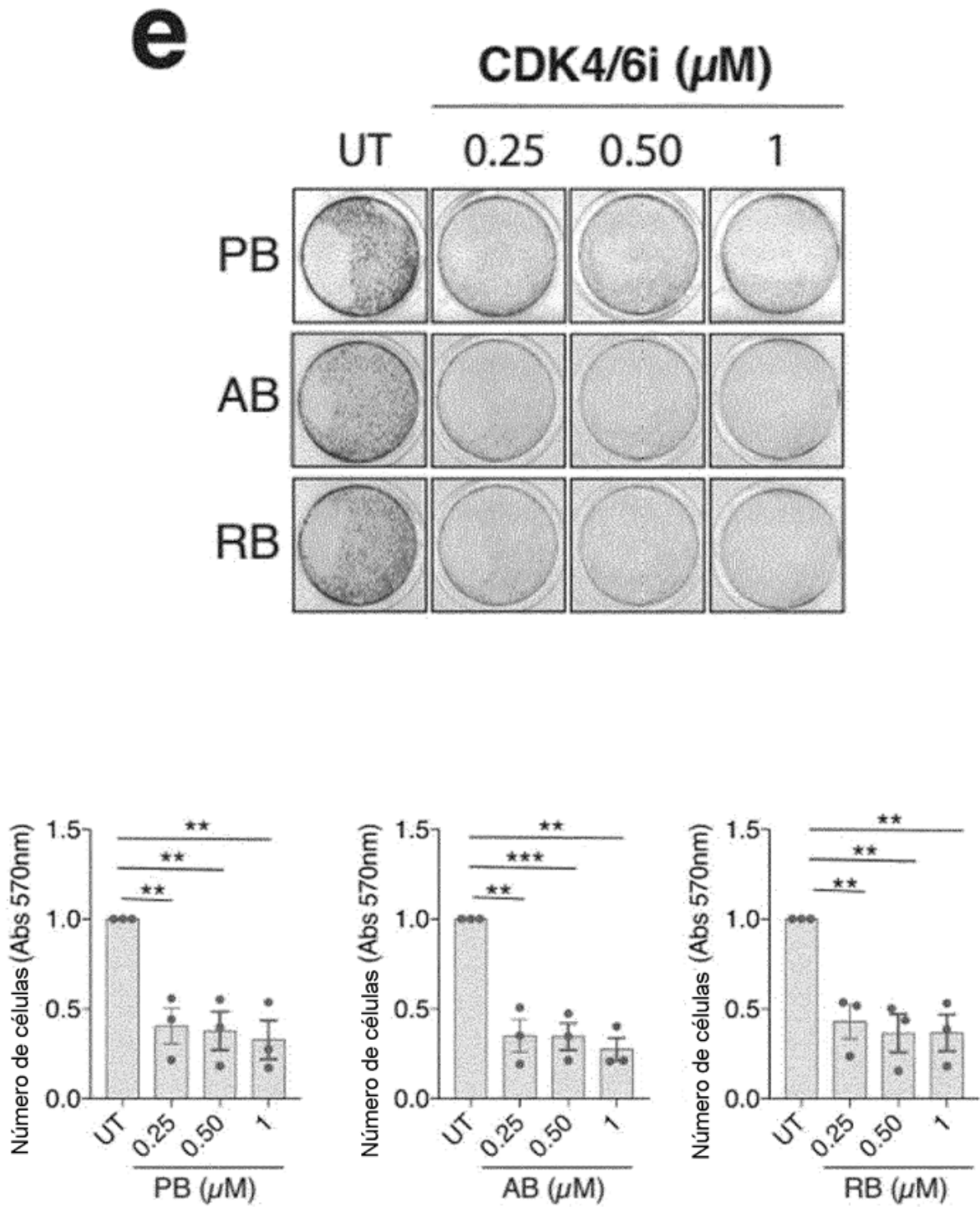
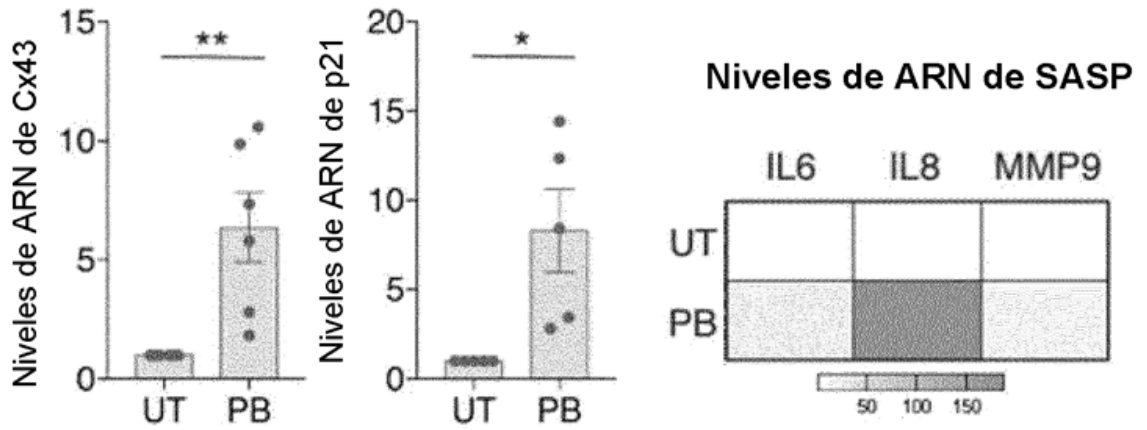


Figura 7 (cont.)

**f**



**g**

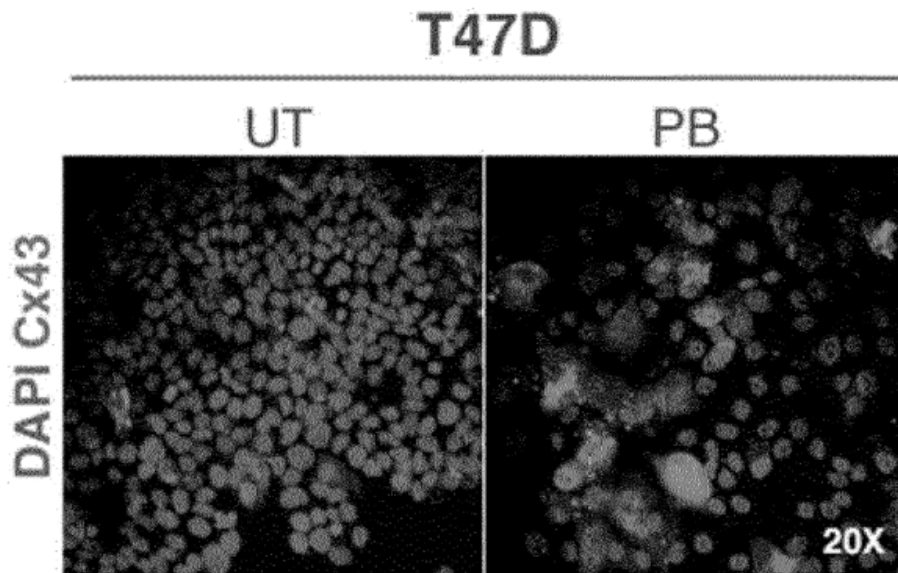


Figura 7 (cont.)

