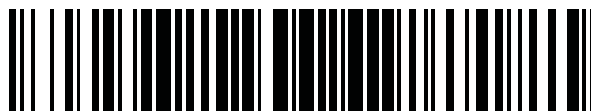


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 918**

21 Número de solicitud: 201031478

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **06.10.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
07.05.2012

71 Solicitante/s:
**FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA
BIOMÈDICA
BALDIRI I REIXAC, 10-12
08028 BARCELONA, ES
FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUCIÓ CATALANA DE
RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS**

72 Inventor/es:
**GOMIS CABRÉ, ROGER;
ARNAL ESTAPÉ, ANNA;
PAVLOVIC, MILICA y
TARRAGONA SUNYER, MARIA**

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

54 Título: **MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA METÁSTASIS DE
CÁNCER DE MAMA.**

57 Resumen:

La presente invención se relaciona con un método para el diagnóstico y/o el pronóstico de metástasis en cáncer de mama ER+ que comprende medir los niveles de expresión del gen c-MAF o de la proteína codificada por dicho gen en el tumor primario, en donde si los niveles de expresión de dicho gen están incrementados respecto a sus niveles de expresión en la muestra control, entonces dicho sujeto presenta un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor propensión a desarrollar una metástasis. Asimismo, la invención también se relaciona con el empleo del gen c-MAF y/o la proteína c-MAF como diana terapéutica para el tratamiento de la metástasis del cáncer de mama ER+.

ES 2 379 918 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA METÁSTASIS DE CÁNCER DE MAMA

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se relaciona con un método para el diagnóstico o el pronóstico de metástasis en cáncer de mama que comprende medir los niveles de expresión del gen o la proteína c-MAF en el tumor primario. Asimismo, la invención también se relaciona con el empleo del gen y/o la proteína c-MAF como diana terapéutica para el tratamiento de la metástasis del cáncer de mama.

10

ANTECEDENTES

15

Mundialmente, el cáncer de mama es el segundo tipo más común de cáncer (10,4%; tras el cáncer de pulmón) y la quinta causa más común de muerte por cáncer (tras el cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de hígado, y cáncer de colon). Entre las mujeres, el cáncer de mama es la causa más común de muerte por cáncer. En 2005, el cáncer de mama produjo 502.000 muertes en el mundo (el 7% de las muertes por cáncer; casi el 1% de todas las muertes). El número de casos mundiales ha aumentado significativamente desde la década de 1970, un fenómeno del que se echa la culpa parcialmente a los estilos de vida modernos en el mundo occidental.

20

25

El cáncer de mama se clasifica en fases según el sistema TNM. El pronóstico está íntimamente unido a los resultados de la clasificación en fases, y la clasificación en fases también se usa para asignar pacientes a tratamientos tanto en ensayos clínicos como en la práctica médica. La información para clasificar en fases es como sigue:

30

- TX: El tumor primario no se puede evaluar. T0: No hay evidencia de tumor. Tis: Carcinoma in situ, no invasión. T1: El tumor es de 2 cm o menos. T2: El tumor es de más de 2 cm pero de menos de 5 cm. T3: El tumor es de más de 5 cm. T4: Tumor de cualquier tamaño que crece en la pared del pecho o piel, o cáncer de mama inflamatorio.

- NX: Los ganglios linfáticos cercanos no se pueden evaluar. N0: El cáncer no se ha extendido a los ganglios linfáticos regionales. N1: El cáncer se ha extendido a 1 a 3 ganglios linfáticos de la axila o a uno mamario interno. N2: El cáncer se ha extendido a 4 a 9 ganglios linfáticos de la axila o a múltiples ganglios mamaros internos. N3: Aplica uno de los siguientes:
 - El cáncer se ha extendido a 10 ó más ganglios linfáticos de la axila, o el cáncer se ha extendido a los ganglios linfáticos bajo la clavícula, o el cáncer se ha extendido a los ganglios linfáticos por encima de la clavícula o el cáncer afecta a los ganglios linfáticos de la axila y se ha extendido a los ganglios linfáticos mamaros internos, o el cáncer afecta a 4 ó más ganglios linfáticos de la axila, y se encuentran cantidades mínimas de cáncer en los ganglios mamaros internos o en biopsia de ganglios linfáticos centinelas.
- MX: La presencia de extensión distante (metástasis) no se puede evaluar. M0: No hay extensión distante. M1: Se ha producido la extensión a órganos distantes, que no incluyen el ganglio linfático supraclavicular.

El hecho de que la mayoría de las muertes en pacientes con cáncer por tumores sólidos se produzca por posterior metástasis hace que sea crucial comprender los mecanismos moleculares y celulares que permiten a un tumor metastatizar. Publicaciones recientes han demostrado cómo la metástasis se produce mediante mecanismos complejos aún poco conocidos y también cómo los diferentes tipos celulares metastáticos presentan un tropismo hacia determinados órganos.

El hecho de que la mayoría de las muertes en pacientes con cáncer por tumores sólidos se produzca por posterior metástasis hace que sea crucial comprender los mecanismos moleculares y celulares que permiten a un tumor metastatizar. Publicaciones recientes han demostrado cómo la metástasis se produce mediante mecanismos complejos aún poco conocidos y también cómo los diferentes tipos celulares metastáticos presentan un tropismo hacia determinados órganos. Estas células metastáticas tejido específicas tienen una serie de funciones adquiridas que le permiten colonizar órganos concretos.

Todas las células tienen receptores en su superficie, en su citoplasma y el núcleo celular. Ciertos mensajeros químicos tales como las hormonas se unen a dichos receptores y esto provoca cambios en la célula. Son tres receptores importantes que pueden afectar a las células del cáncer de mama: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y HER2/neu. Las células que tengan alguno de estos receptores se les coloca un signo positivo para el receptor presente y un signo negativo si está ausente: ER+ (positivo), ER negativo (ER-), PR+ (positivo), PR negativo (PR-), HER2+ (positivo) y HER2 negativo (HER2-). El estado de receptor ha convertido en una evaluación crítica de todos los cánceres de mama, ya que determina la idoneidad del uso de tratamientos específicos, por ejemplo, tamoxifeno y o trastuzumab. La isoforma alfa del receptor de estrógenos (ER), está sobreexpresada en alrededor del 65% de los casos de cáncer de mama diagnosticados. Este tipo de cáncer de mama se refiere como “ER-positivo” (ER+). En este caso la unión del estrógeno al ER estimula la proliferación de las células mamarias tumorales. Las células tumorales ER+ son altamente dependientes de este estímulo para proliferar por lo que el ER se utiliza en la actualidad como una diana terapéutica.

El pilar principal del tratamiento de cáncer de mama es la cirugía cuando el tumor está localizado, con posible terapia adyuvante hormonal (con tamoxifeno o un inhibidor de aromatasas), quimioterapia, y/o radioterapia. En la actualidad, las recomendaciones de tratamiento después de la cirugía (terapia adyuvante) siguen un patrón. Este patrón está sujeto a cambio, ya que cada dos años, tiene lugar una conferencia mundial en St. Gallen, Suiza, para discutir los resultados reales de los estudios multicentros mundiales. Asimismo, dicho patrón también se revisa según el criterio consenso del National Institute of Health (NIH). Basándose en estos criterios, más del 85-90% de los pacientes que no presentan metástasis en nódulos linfáticos serían candidatos para recibir terapia sistémica adyuvante.

En la actualidad, ensayos de PCR como Oncotype DX o ensayos de microarrays como MammaPrint pueden predecir el riesgo de recaída del cáncer de mama basada en la expresión de determinados genes. En febrero de 2007, el ensayo MammaPrint se convirtió en el primer indicador de cáncer de mama en conseguir autorización oficial de la Food and Drug Administration.

La solicitud de patente EP1961825 describe un método para predecir la aparición de metástasis de cáncer de mama a hueso, pulmón, hígado o cerebro, que comprende determinar en una muestra de tejido tumoral el nivel de expresión de uno o más marcadores respecto a su correspondiente nivel de expresión en una muestra control, entre
5 los que se encuentra c-MAF. Sin embargo, este documento requiere la determinación de varios genes simultáneamente para poder determinar la supervivencia de pacientes de cáncer de mama y la correlación entre la capacidad de la firma genómica de predecir la supervivencia libre de metástasis a hueso no resultó estadísticamente significativa.

10 Bos, P.D., *et al.* [Nature, 2009, 459:1005-1009] describe genes involucrados en la metástasis de cáncer de mama al cerebro.

La solicitud de patente US2005/0181375 describe métodos para la detección de cáncer de mama metastásico basados en la detección de los niveles de expresión de una serie de
15 genes que se encuentran regulados al alza o a la baja en tumores metastasicos y, en particular, en tumores que metastizan al cerebro.

La solicitud de patente internacional WO2010/000907 describe una firma genética útil como predictor genómico de metástasis distal en pacientes de cáncer de mama.

20

Sin embargo, no existen en el estado de la técnica marcadores genéticos que permitan diagnosticar y/o pronosticar si un paciente que sufre un determinado cáncer de mama, como es el cáncer de mama ER+ , va a sufrir o no metástasis, pudiendo aplicar de esta manera una terapia adecuada al sujeto que padece dicho cáncer. Por lo tanto, existe la
25 necesidad de identificar nuevos marcadores que permitan diagnosticar la presencia de metástasis en sujetos que padecen cáncer de mama ER+ y/o predecir la probabilidad de un sujeto que padece cáncer de mama ER+ a desarrollar metástasis. La identificación de nuevos factores de pronóstico servirá para guiar en la selección de los tratamientos más adecuados.

30

COMPENDIO DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han identificado y validado un gen cuyo cambio de expresión está directamente relacionado con metástasis del cáncer de mama ER+, en particular, con metástasis al hueso de cáncer de mama ER+. Los inventores han descubierto que el gen c-MAF está sobre-expresado en metástasis de cáncer de mama ER+. Sin querer estar vinculado a ninguna teoría en particular, se piensa que la vía de señalización del receptor de estrógenos (ER) contribuye a la metástasis del cáncer de mama liderando los eventos moleculares necesarios para que se produzca dicha metástasis.

10

El papel del gen c-MAF en metástasis de cáncer de mama ER+ ha sido caracterizado por los inventores mediante la inoculación a ratones inmunodeficientes de la línea celular MCF7 (línea celular de cáncer de mama humana ER+), para después obtener el perfil de expresión asociado a células MCF7 aisladas en hueso como consecuencia del proceso de metástasis a dicho órgano. A partir de dicho perfil de expresión y aplicando diversos criterios, se seleccionó el gen C-MAF cuyas variaciones en los niveles de expresión predicen recurrencia a hueso en tumores primarios de cáncer de mama. Posteriormente, los niveles de expresión de c-MAF fueron estudiados en dos bases de datos distintas que contienen los perfiles de expresión y las anotaciones clínicas de tumores primarios de pacientes con cáncer de mama y de metástasis de pacientes de cáncer de mama, observándose que la expresión génica de c-MAF se correlaciona de forma positiva con distintos parámetros clínicos, incluida la recurrencia y la metástasis. Finalmente, el gen c-MAF fue validado individualmente mediante ensayos de colonización de metástasis *in vivo* seguido de experimentos de ganancia mediante vectores lentivirales y pérdida de función mediante el empleo de ARN de interferencia (ARNip) demostraron el papel de C-MAF como marcador de pronóstico y como un gen diana en la metástasis del cáncer de mama ER+, en particular, metástasis al hueso del cáncer de mama ER+.

20

25

30

En base a dicho descubrimiento, los inventores han desarrollado los siguientes aspectos inventivos:

- Un método *in vitro* para diagnosticar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+ y/o pronosticar la propensión a desarrollar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+ que comprende
 - 5 (i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tejido tumoral de dicho sujeto y
 - (ii) comparar el nivel de expresión previamente obtenido con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra control,en donde si los niveles de expresión de dicho gen están incrementados respecto los niveles de expresión de dicho gen en la muestra control, entonces dicho sujeto
10 presenta un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor propensión a desarrollar una metástasis.

- Un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un sujeto afectado de cáncer de mama ER+ que comprende
 - 15 (i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tejido tumoral de dicho sujeto y
 - (ii) comparar el nivel de expresión previamente obtenido con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra control,en donde si los niveles de expresión están incrementados respecto a los niveles de
20 expresión de dicho gen en la muestra control, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia dirigida a evitar y/o tratar la metástasis.

- Uso de un agente inhibidor de la expresión del gen c-MAF o de la proteína codificada por dicho gen en la elaboración de un medicamento para en el tratamiento y/o la
25 prevención de la metástasis de cáncer de mama ER+.

- Uso de un kit que comprende un reactivo para cuantificar los niveles de expresión del gen c-MAF para diagnosticar y/o pronosticar metástasis en un sujeto que padece
30 cáncer de mama ER+ o para diseñar una terapia personalizada a un sujeto afectado de cáncer de mama ER+.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. A) Esquema gráfico del proceso de selección *in vivo* de las subpoblaciones metastáticas tejido-específicas. Cada una de las subsiguientes generaciones metastáticas a hueso es designada BoM0, BoM1 y BoM2. La capacidad metastática de estos tipos celulares fue analizada mediante inyección intra-cardíaca en un modelo xenógrafo en ratón inmunodeprimido. B) agrupación jerárquica obtenida a partir de los perfiles transcripcionales de las células de cáncer de mama ER+ parentales y sus subsiguientes derivadas metastáticas BoM0, BoM1 y BoM2. C) Niveles de expresión de c-MAF en lesiones metastáticas a hueso frente a lesiones metastáticas a otros tejidos. Este análisis se realizó sobre un conjunto de perfiles de expresión procedentes de 46 lesiones metastáticas en pacientes (base de datos Gene Expression Omnibus, número de acceso GSE 14020) D) Curva Kaplan-Meier donde se separan los grupos de pacientes en función a los niveles de expresión de c-MAF y se indica la probabilidad en el tiempo para cada grupo de pacientes de recaída y metástasis al hueso. El conjunto de datos incluye 560 tumores primarios de cáncer de mama. Los análisis se restringieron a los tumores ER+ y ER- respectivamente (base de datos Gene Expression Omnibus, número de acceso GSE 2603, 2034 y 12276) E) Los niveles de expresión de c-MAF se utilizaron para separar los perfiles de expresión de los 338 tumores de cáncer de mama primarios descritos en la cohorte del NKI. Se muestra de forma comparativa mediante curva Kaplan-Meier, la probabilidad de supervivencia de los pacientes de cada grupo a lo largo del tiempo. Los datos p-valor que se muestran en C, D y E indican que la intersección entre la expresión del gen c-MAF y el ER, usando estos valores como variables continuas, predice de modo independiente y significativo la recurrencia o metástasis utilizando un modelo multivariante tipo COX (p-valor<0.01)

Figura 2. A) Análisis de los niveles de expresión de c-MAF en las células de cáncer de mama ER+ MCF7, y sus derivados metastáticos (BoM) mediante RT-PCR cuantitativa. B y C) Experimento de pérdida y ganancia de función de c-MAF. La pérdida y la ganancia de c-MAF se ha realizado en células altamente y poco metastáticas a hueso respectivamente. Las líneas celulares derivadas con y sin expresión de c-MAF son inyectadas en el ventrículo izquierdo de los ratones inmunodeprimidos y se analiza la colonización a hueso *in vivo* y en tiempo real mediante técnicas de imagen por

bioluminiscencia para validar la contribución de c-MAF a la metástasis a hueso en cáncer de mama ER+.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5

Los autores de la presente invención han identificado y validado un gen cuyo cambio de expresión está directamente relacionado con metástasis del cáncer de mama ER+, en particular, con metástasis al hueso de cáncer de mama ER+. Los inventores han descubierto que el gen c-MAF, sorprendentemente, está sobre-expresado en metástasis de
10 cáncer de mama ER+. Sin querer estar vinculado a ninguna teoría en particular, se piensa que la vía de señalización del receptor de estrógenos (ER) contribuye a la metástasis del cáncer de mama liderando los eventos moleculares necesarios para que se produzca dicha metástasis.

15 El papel del gen c-MAF en metástasis de cáncer de mama ER+ ha sido caracterizado por los inventores mediante la inoculación a ratones inmunodeficientes de la línea celular MCF7 (línea celular de cáncer de mama humana ER+), para después obtener el perfil de expresión asociado a células MCF7 aisladas en hueso como consecuencia del proceso de metástasis a dicho órgano. A partir de dicho perfil de expresión y aplicando diversos
20 criterios, se seleccionó el gen c-MAF que fue validado individualmente mediante ensayos de colonización de metástasis *in vivo*. Posteriormente, experimentos de ganancia y pérdida de función mediante el empleo de ARN de interferencia (ARNip) demostraron el papel de c-MAF como marcador de pronóstico y como un gen diana en la metástasis del cáncer de mama ER+, en particular, metástasis al hueso del cáncer de mama ER+.

25

En base a este descubrimiento, los inventores han desarrollado un conjunto de aspectos inventivos que serán descritos en detalle a continuación.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE LA INVENCION

30

Los inventores han descubierto que el gen c-MAF está sobre-expresado en metástasis de cáncer de mama ER+ así como que los niveles de expresión de c-MAF se correlacionan

con distintos parámetros clínicos del cáncer de mama, en particular, con recurrencia y probabilidad de metástasis. Por tanto, c-MAF puede emplearse como marcador de metástasis para diagnosticar y/o pronosticar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+.

5

El gen c-MAF (*v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue* (avian), también conocido como MAF o MGC71685) es un factor de transcripción que contiene una cremallera de leucinas que actúa como un homodímero o como un heterodímero. Dependiendo del sitio de unión al ADN, la proteína codificada puede ser un activador o un repressor transcripcional. La secuencia de ADN que codifica c-MAF se describe en la base de datos NCBI bajo el número de acceso NG_016440 (SEQ ID NO: 1). A partir de dicha secuencia de ADN, se transcriben dos ARN mensajeros, cada uno de los cuales dará lugar a una de las dos isoformas de la proteína c-MAF, la isoforma α y la isoforma β . Las secuencias de ADN complementario para cada una de dichas isoformas se describen, respectivamente, en la base de datos NCBI bajo los números de acceso NM_005360.4 (SEQ ID NO: 2) y NM_001031804.2 (SEQ ID NO: 3).

Así, en un aspecto la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+ (en adelante, primer método diagnóstico de la invención) y/o pronosticar la propensión a desarrollar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+ (en adelante, segundo método diagnóstico de la invención) que comprende

- (i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tejido tumoral de dicho sujeto y
- (ii) comparar el nivel de expresión previamente obtenido con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra control,

en donde si los niveles de expresión de dicho gen están incrementados respecto los niveles de expresión de dicho gen en la muestra control, entonces dicho sujeto presenta un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor propensión a desarrollar una metástasis.

30

En el contexto de la presente invención, se entiende por “metástasis” a la propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició. Ocurre generalmente por

vía sanguínea o linfática. Cuando las células cancerosas se diseminan y forman un tumor nuevo, éste se llama un secundario, o tumor metastásico. Las células del cáncer que forman el tumor secundario son como las del tumor original. Por ejemplo, si un cáncer de mama se disemina (metastatiza) al pulmón, el tumor secundario está formado de células malignas del cáncer de mama. La enfermedad en el pulmón es cáncer de mama metastásico y no cáncer de pulmón. En una realización particular del método de la invención, la metástasis es cáncer de mama ER+ que se ha diseminado (metastizado) al hueso.

En la presente invención, se entiende por “cáncer de mama ER+” al cáncer de mama cuyas células tumorales expresan el receptor de estrógeno (ER). Esto hace a dichos tumores sensibles a los estrógenos, lo cual significa que el estrógeno hace que el tumor canceroso mamario crezca.

En la presente invención, se entiende por “diagnostico de metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+” a reconocer una enfermedad (metástasis) mediante el examen de sus signos, es decir, en el contexto de la presente invención, mediante unos niveles de expresión aumentados (es decir, sobre-expresión) del gen c-MAF en el tejido tumoral de cáncer de mama ER+ respecto a una muestra control.

En la presente invención se entiende por “pronosticar la propensión a desarrollar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+” a conocer a partir de indicios si el cáncer de mama ER+ que afecta a dicho sujeto va a sufrir metástasis en un futuro. En el contexto de la presente invención, el indicio es la sobre-expresión del gen c-MAF en el tejido tumoral.

25

El método de la invención comprende, en una primera etapa, cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tejido tumoral un sujeto.

El término “sujeto” o “paciente”, como se usa aquí, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no está restringido a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas,

30

caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

En la presente invención se entiende por “muestra de tejido tumoral” a la muestra de tejido
5 procedente del tumor primario de cáncer de mama ER+. Dicha muestra se puede obtener mediante métodos convencionales, por ejemplo, biopsia, utilizando métodos bien conocidos para los expertos en las técnicas médicas relacionadas. Los métodos para obtener una muestra de la biopsia incluyen partición en trozos grandes de un tumor, o microdissección u otros métodos de separación de células conocidos en la técnica. Las
10 células tumorales se pueden obtener de forma adicional mediante citología por aspiración con una aguja fina. Para simplificar la conservación y el manejo de las muestras, estas se pueden fijar en formalina y embeber en parafina o congelar primero y después embeber en un medio criosolidificable, tal como compuesto OCT, mediante inmersión en un medio altamente criogénico que permite la congelación rápida.

15

Como entiende el experto en la materia, la cuantificación de los niveles de expresión un gen se puede determinar midiendo los niveles del ARN mensajero de dicho gen o de la proteína codificada por dicho gen.

20 Para este fin, la muestra biológica se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o la célula, liberando los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para preparar los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se extraen mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia y disponibles comercialmente (Sambroock, J., et al., “Molecular cloning: a Laboratory Manual”, 3rd ed.,
25 Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.)

Así, la cuantificación del nivel de expresión del gen c-MAF puede realizarse a partir del ARN resultante de la transcripción de dicho gen (ARN mensajero o ARNm) o, alternativamente, a partir del ADN complementario (ADNc) de dicho gen. Por tanto, en
30 una realización particular de la invención, la cuantificación de los niveles de expresión del gen c-MAF comprende la cuantificación del ARN mensajero del gen c-MAF, o un

fragmento de dicho ARNm, ADN complementario del gen c-MAF, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.

Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm codificados por el gen c-MAF o de su ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm codificados por dicho gen pueden ser cuantificados mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante Southern blot y empleo de sondas apropiadas, northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm del gen de interés (c-MAF) o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-LCR, hibridación, microarrays, etc., preferentemente, mediante PCR cuantitativa a tiempo real usando un marcador apropiado. Análogamente, los niveles del ADNc correspondiente a dicho ARNm codificado por el gen c-MAF también pueden ser cuantificados mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente ADNc mediante transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho ADNc. Métodos convencionales de cuantificar los niveles de expresión pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook y cols., 2001. (citado *ad supra*).

En una realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión del gen c-MAF se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o un array de ADN o ARN.

25

Por otro lado, la cuantificación del nivel de expresión del gen c-MAF también puede realizarse mediante la cuantificación de los niveles de expresión de la proteína codificada por dicho gen, es decir, la proteína c-MAF (c-MAF) [NCBI, número de acceso O75444], o cualquier variante funcionalmente equivalente de la proteína c-MAF. Existen dos isoformas de la proteína c-MAF, la isoforma α (NCBI, NP_005351.2) compuesta de 403 aminoácidos (SEQ ID NO: 4) y la isoforma β (NP_001026974.1) compuesta de 373 aminoácidos (SEQ ID NO: 5). La cuantificación del nivel de expresión del gen c-MAF

30

puede llevarse a cabo mediante la cuantificación de los niveles de expresión de cualquiera de las isoformas de la proteína c-MAF. Así, en una realización particular, la cuantificación de los niveles de la proteína codificada por el gen c-MAF comprende la cuantificación de la proteína c-MAF.

5

En el contexto de la presente invención, se entiende por “variante funcionalmente equivalente de la proteína c-MAF” a (i) variantes de la proteína c-MAF (SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5) en las que uno o más de los restos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado), en donde tal residuo de aminoácido sustituido puede ser o puede no ser uno codificado por el código genético, o (ii) variantes que comprenden una inserción o una delección de uno o más aminoácidos, y que desempeña la misma función que la proteína c-MAF, es decir, actuar como un factor de transcripción de unión al ADN. Variantes de la proteína c-MAF pueden identificarse usando métodos basados en la capacidad de c-MAF promover la proliferación celular *in vitro*, tal como se muestra en la solicitud de patente internacional WO2005/046731, basados en la capacidad del supuesto inhibidor para bloquear la capacidad la transcripción de un gen reportero bajo el control del promotor de ciclina D2 o de un promotor que contenga la región de respuesta a c-MAF (MARE o c-MAF *responsive element*) en células que expresan c-MAF tal y como se describe en WO2008098351 o basados en la capacidad del supuesto inhibidor de bloquear la expresión de un gen reportero bajo el control del promotor de IL-4 en respuesta a la estimulación con PMA/ionomicina en células que expresan NFATc2 y c-MAF tal y como se describe en US2009048117A.,

25 Las variantes según la invención tienen preferentemente una identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las isoformas de la proteína c-MAF (SEQ ID NO: 4 ó SEQ ID NO: 5) de, al menos, el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. El grado de identidad entre las variantes y las secuencias específicas de proteína c-MAF definidas anteriormente se determina usando algoritmos y procedimientos informáticos que son ampliamente conocidos para los expertos en la materia. La identidad

30

entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP [BLAST Manual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

5 El nivel de expresión de la proteína c-MAF puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dicha proteína pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a c-MAF (o a fragmentos de la misma que contenga un determinante antigénico) y la posterior
10 cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente
15 invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e
20 inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar dicha proteína c-MAF, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc. Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que
25 se sabe se une a la proteína c-MAF con alta afinidad para detectar la cantidad de la misma. Sin embargo, se prefiere el uso de un anticuerpo, por ejemplo, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados. En el mercado, existen anticuerpos comerciales contra la proteína c-MAF
30 que pueden emplearse en el contexto de la presente invención, como por ejemplo, los anticuerpos ab427, ab55502, ab55502, ab72584, ab76817, ab77071 (Abcam plc, 330 Science Park, Cambridge CB4 0FL, United Kingdom), el anticuerpo monoclonal O75444

(Mouse Anti-Human MAF Azide free Monoclonal antibody, Unconjugated, Clone 6b8) de AbD Serotec, etc. Son múltiples las casas comerciales que ofrecen anticuerpos anti-c-MAF, como Abnova Corporation, Bethyl Laboratories, Bioworld Technology, GeneTex, etc.

5

En una realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína c-MAF se realiza mediante western blot, ELISA o un array de proteínas.

El método de la invención comprende, en una segunda etapa, comparar el nivel de expresión del gen c-MAF obtenido en la muestra tumoral del sujeto con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra control.

Una vez medidos los niveles de expresión del gen c-MAF en una muestra de tejido tumoral de un sujeto afectado de cáncer de mama ER+ y comparados con la muestra control, si los niveles de expresión de dicho gen están incrementados respecto a sus niveles de expresión en la muestra control, entonces se puede concluir que dicho sujeto presenta un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor propensión a desarrollar una metástasis.

La determinación de los niveles de expresión del gen c-MAF necesita ser correlacionada con valores de una muestra control o muestra de referencia que corresponden al nivel de expresión del gen c-MAF medido en una muestra de tejido tumoral de sujeto con cáncer de mama ER+ que no ha sufrido metástasis o que corresponden al valor mediana de los niveles de expresión del gen c-MAF medidos en una colección de tejidos tumorales en muestras de biopsias de sujetos con cáncer de mama ER+ que no ha sufrido metástasis. Dicha muestra de referencia se obtiene típicamente combinando cantidades iguales de muestras de una población de sujetos. En general, las muestras de referencia típicas se obtendrán de sujetos que están clínicamente bien documentados y en los que la ausencia de metástasis se encuentra bien caracterizada. En tales muestras, las concentraciones normales (de referencia) del biomarcador (gen c-MAF) se pueden determinar, por ejemplo proporcionando la concentración media sobre la población de referencia. Al determinar la concentración de referencia del marcador se toman en cuenta varias consideraciones. Entre tales consideraciones están la edad, peso, sexo, estado físico general del paciente y

similares. Por ejemplo, se toman como grupo de referencia cantidades iguales de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 a preferiblemente más de 1000 sujetos, preferiblemente clasificados según las consideraciones anteriores, por ejemplo de varias categorías de edad. La colección de muestras de las que deriva el nivel de referencia estará
5 preferiblemente constituida de sujetos que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente objeto de estudio.

Una vez que se ha establecido este valor mediana, se puede comparar el nivel de este marcador expresado en tejidos tumorales de pacientes con este valor mediana, y de esta
10 manera ser asignado al nivel de expresión “incrementada”. Debido a la variabilidad entre sujetos (por ejemplo, aspectos referidos a la edad, raza, etc.) es muy difícil (si no prácticamente imposible) establecer valores de referencia absolutos de expresión de C-MAF. De esta manera, en una forma de realización particular, los valores de referencia para expresión “incrementada” o “disminuida” de la expresión de C-MAF se determinan
15 calculando los percentiles por medios convencionales que implica ensayar en una o varias muestras aisladas de sujetos en los que la enfermedad se encuentra bien documentada por alguno de los métodos mencionados anteriormente los niveles de expresión de C-MAF. Los niveles “reducidos” de C-MAF se pueden entonces asignar, preferiblemente, a muestras en donde los niveles de expresión de C-MAF son iguales a o inferiores al
20 percentil 50 en la población normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de expresión iguales a o inferiores del percentil 60 en la población normal, iguales a o inferiores al percentil 70 en la población normal, iguales a o inferiores al percentil 80 en la población normal, iguales a o inferiores al percentil 90 en la población normal, e iguales a o inferiores al percentil 95 en la población normal. Los niveles de expresión “incrementados” del gen c-
25 MAF se pueden entonces asignar, preferiblemente, a muestras en donde los niveles de expresión del gen c-MAF son iguales a o superan el percentil 50 en la población normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de expresión iguales a o en exceso al percentil 60 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 70 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 80 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 90 en la
30 población normal, e iguales a o en exceso al percentil 95 en la población normal.

En la presente invención se entiende por “niveles de expresión incrementados” cuando el nivel de expresión se refiere a niveles del gen c-MAF superiores a los que aparecen en una muestra de referencia o muestra control. En particular, se puede considerar que una muestra presenta niveles altos de expresión de c-MAF cuando los niveles de expresión son
5 en la muestra de referencia son de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a la muestra aisladas del paciente.

En el contexto de la presente invención se entiende que “un sujeto presenta un diagnóstico
10 positivo de metástasis” cuando el cáncer de mama ER+ padecido por dicho sujeto ha sufrido metástasis a otros órganos del cuerpo, en una realización particular, al hueso.

En una forma de realización aún más preferida, la metástasis a hueso es metástasis ósea osteolítica. La expresión “metástasis ósea osteolítica”, según se usa en la presente
15 invención se refiere a un tipo de metástasis en la que se produce resorción ósea (pérdida progresiva de la densidad ósea) en la proximidad de la metástasis resultante de la estimulación de la actividad de los osteoclastos por las células del tumor y caracterizada por dolor severo, fracturas patológicas, hipercalcemia, compresión de la médula espinal y otros síndromes resultantes de la compresión de los nervios.

20

Por otro lado, en la presente invención se entiende que “un sujeto presenta una mayor propensión a desarrollar una metástasis” cuando las probabilidades de que el cáncer de mama ER+ padecido por el sujeto sufra metástasis en un futuro son altas.

25 MÉTODO DE TERAPIA PERSONALIZADA DE LA INVENCION

Como es conocido del estado de la técnica, el tratamiento a administrar a un sujeto que padece cáncer depende de si éste es un tumor maligno, es decir, tiene altas probabilidades de sufrir metástasis, o si éste es un tumor benigno. En el primer supuesto, el tratamiento de
30 elección es un tratamiento sistémico como la quimioterapia y en el segundo supuesto, el tratamiento de elección es un tratamiento localizado como la radioterapia.

Por lo tanto, según se describe en la presente invención, sabiendo que la sobreexpresión del gen c-MAF en células de cáncer de mama ER+ está relacionado con la presencia de metástasis, entonces se puede decidir cuál es la terapia más adecuada para el sujeto que padece dicho cáncer en función de los niveles de expresión del gen C-MAF.

5

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un sujeto afectado de cáncer de mama ER+ (de aquí en adelante, método de terapia personalizada de la invención) que comprende

(i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tejido tumoral de dicho sujeto y

10

(ii) comparar el nivel de expresión previamente obtenido con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra control,

en donde si los niveles de expresión están incrementados respecto a los niveles de expresión de dicho gen en la muestra control, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia dirigida a evitar y/o tratar la metástasis.

15

Los términos y expresiones “sujeto”, “muestra”, “metástasis”, “determinación de niveles de expresión”, “gen c-MAF”, “niveles de expresión incrementados” y “muestra control” han sido descritos en detalle en relación con el primer método de la invención y son igualmente aplicables al segundo método de la invención.

20

Cuando el cáncer ha producido metástasis, se emplean tratamientos sistémicos entre los que se incluyen, sin limitarse a, quimioterapia, tratamiento hormonal, inmunoterapia, o una combinación de éstos. Adicionalmente, puede emplearse radioterapia y/o cirugía. La elección del tratamiento depende generalmente del tipo de cáncer primario, del tamaño, la localización de la metástasis, la edad, la salud general del paciente y los tipos de tratamientos usados previamente.

25

Los tratamientos sistémicos son aquellos que llegan a todo el cuerpo:

30

- La quimioterapia ("quimio") es el uso de medicamentos para destruir las células cancerosas. Por lo general, los medicamentos se administran vía oral o intravenosa. En ocasiones, la quimioterapia es utilizada junto con el tratamiento con radiación.

- La terapia hormonal se basa en que algunas hormonas promueven el crecimiento de algunos cánceres. Por ejemplo, el estrógeno en la mujer, que es producido por los ovarios, a veces promueve el crecimiento del cáncer de seno. Existen varias formas de detener la producción de estas hormonas. Una forma es extirpar los órganos que las producen: los ovarios en el caso de las mujeres, los testículos en el caso de los hombres. Más frecuentemente, se pueden usar medicamentos para impedir que estos órganos produzcan las hormonas o para evitar que las hormonas actúen sobre las células cancerosas.
- La inmunoterapia es un tratamiento que ayuda al propio sistema inmunitario del paciente para combatir el cáncer. Hay varios tipos de inmunoterapia que se utilizan para tratar los pacientes con metástasis. Estos incluyen, pero no se limitan a, citocinas, anticuerpos monoclonales y vacunas antitumorales.

Adicionalmente, en el tratamiento de la metástasis también pueden emplearse los radiofármacos y bifosfatos. Los radiofármacos son un grupo de medicamentos que tienen elementos radiactivos. Se inyectan a través de una vena y se asientan en las partes del hueso que tienen cáncer. Estos medicamentos destruyen las células cancerosas. Los bifosfonatos son medicamentos se usan para el tratamiento de los huesos debilitados (osteoporosis), pero que también se utilizan para tratar a pacientes cuyos cánceres se han propagado a sus huesos.

En una realización particular del segundo método de la invención, la metástasis es metástasis en hueso. En una forma de realización aún más preferida, la metástasis a hueso es metástasis ósea osteolítica.

Alternativamente, la invención se relaciona con un método de tratamiento de una metástasis de cáncer de mama ER⁺ en un sujeto, en particular, metástasis de cáncer de mama ER⁺ al hueso, que comprende la administración a dicho paciente de un inhibidor de la expresión del gen c-MAF o de la proteína codificada por dicho gen, es decir, la proteína c-MAF.

MÉTODOS TERAPÉUTICOS DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que la inhibición de la expresión de c-MAF en un modelo de colonización metastática a hueso en un modelo experimental xenógrafo de metástasis de cáncer de mama en ratones resulta en una 5 disminución estadísticamente significativa en la formación de metástasis a hueso. Por el contrario, la sobreexpresión de c-MAF en células tumorales en ese mismo sistema provoca un aumento en la capacidad metastásica de dichas células. Así, un agente inhibidor de la expresión del gen c-MAF o de la proteína codificada por dicho gen puede emplearse en el 10 tratamiento y/o la prevención de la metástasis de cáncer de mama ER+.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un agente inhibidor de la expresión del gen c-MAF o de la proteína codificada por dicho gen (de aquí en adelante, agente inhibidor de la invención) en la elaboración de un medicamento para en el 15 tratamiento y/o la prevención de la metástasis de cáncer de mama ER+. Alternativamente, la invención se relaciona con un agente inhibidor de la expresión del gen c-MAF o de la proteína codificada por dicho gen para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la metástasis de cáncer de mama ER+. Alternativamente, la invención se relaciona con un método de tratamiento de la metástasis de cáncer de mama ER+ en un sujeto que 20 comprende la administración a dicho sujeto de un inhibidor de c-MAF.

Un “agente inhibidor de c-MAF”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier molécula capaz de inhibir total o parcialmente la expresión del gen c-MAF, tanto impidiendo que se produzca el producto de expresión de dicho gen (interrumpiendo la 25 transcripción del gen c-MAF y/o bloqueando la traducción del ARNm procedente de la expresión del gen c-MAF) como directamente inhibiendo la actividad de la proteína c-MAF. Inhibidores de la expresión del gen c-MAF pueden identificarse usando métodos basados en la capacidad del supuesto inhibidor de bloquear la capacidad de c-MAF para promover la proliferación celular *in vitro*, tal como se muestra en la solicitud de patente 30 internacional WO2005/046731, basados en la capacidad del supuesto inhibidor para bloquear la capacidad la transcripción de un gen reportero bajo el control del promotor de ciclina D2 o de un promotor que contenga la región de respuesta a c-MAF (MARE o c-

MAF *responsive element*) en células que expresan c-MAF tal y como se describe en WO2008098351 o basados en la capacidad del supuesto inhibidor de bloquear la expresión de un gen reportero bajo el control del promotor de IL-4 en respuesta a la estimulación con PMA/ionomicina en células que expresan NFATc2 y c-MAF tal y como se describe en
5 US2009048117A.

A modo ilustrativo y no limitativo, agentes inhibidores de c-MAF adecuados para su uso en la presente invención incluyen oligonucleótidos antisentido, ARNs de interferencia (ARNips), ARNs catalíticos o ribozimas específicos y anticuerpos inhibidores.

10

Oligonucleótidos antisentido

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de ácidos nucleicos “antisentido” aislados para inhibir la expresión, por ejemplo inhibiendo la transcripción y/o traducción
15 de un ácido nucleico que codifica c-MAF cuya actividad se desea inhibir. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden unir a la diana potencial de la droga mediante complementariedad de bases convencional o, por ejemplo, en el caso de unirse a ADN bicatenario, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. En general, estos métodos se refieren al rango de técnicas generalmente empleadas en la
20 técnica e incluyen cualquier método que se basa en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

Una construcción antisentido de la presente invención se puede distribuir, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que
25 es complementario a al menos una parte única del ARNm celular que codifica c-MAF. De forma alternativa, la construcción antisentido es una sonda de oligonucleótidos que se genera *ex vivo* y que, cuando se introduce en la célula, produce inhibición de la expresión génica hibridando con el ARNm y/o secuencias genómicas de un ácido nucleico diana. Tales sondas de oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados, que
30 son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y que son por lo tanto estables *in vivo*. Moléculas de ácidos nucleicos ejemplares para su uso como oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN de fosforamidato, fosfotionato y

metilfosfonato (ver también las patentes de EE.UU. Nos. 5176996; 5264564; y 5256775). Adicionalmente, se han revisado las aproximaciones generales para construir oligómeros útiles en la terapia antisentido, por ejemplo, en Van der Krol et al., *BioTechniques* 6: 958-976, 1988; y Stein et al., *Cancer Res* 48: 2659-2668, 1988.

5

Respecto al oligonucleótido antisentido, son preferidas las regiones de oligodesoxirribonucleótidos derivadas del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre -10 y +10 del gen diana. Las aproximaciones antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (bien ADN bien ARN) que son complementarios al ARNm que codifica el polipéptido diana. Los oligonucleótidos antisentido se unirán a los transcritos de ARNm y prevendrán la traducción.

Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del ARNm, por ejemplo la secuencia 5' no traducida hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, deberían funcionar de la forma más eficaz para inhibir la traducción. Sin embargo, se ha mostrado recientemente que las secuencias complementarias a las secuencias 3' no traducidas de los ARNm también son eficaces para inhibir la traducción de los ARNMs (Wagner, *Nature* 372: 333, 1994). Por lo tanto, se podrían usar oligonucleótidos complementarios bien a las regiones 5' ó 3' no traducidas, no codificantes de un gen en una aproximación antisentido para inhibir la traducción de ese ARNm. Los oligonucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm deberían incluir el complemento del codón de iniciación AUG. Los oligonucleótidos complementarios a las regiones codificantes del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficaces pero también se podrían usar según la invención. Si están diseñados para hibridar con la región 5', 3' o codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deberían tener al menos seis nucleótidos de longitud y tener preferiblemente menos de alrededor de 100 y más preferiblemente menos de alrededor de 50, 25, 17 ó 10 nucleótidos de longitud.

Se prefiere que se realicen primero estudios *in vitro* para cuantificar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de inhibir la expresión génica. Se prefiere que estos estudios utilicen controles que distinguen entre inhibición génica antisentido y efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También se prefiere que esos estudios comparen los

niveles del ARN o proteína diana con el de un control interno de ARN o proteína. Los resultados obtenidos usando los oligonucleótidos antisentido se pueden comparar con los obtenidos usando un oligonucleótido control. Se prefiere que el oligonucleótido control sea aproximadamente de la misma longitud que el oligonucleótido a ensayar y que la secuencia del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo que sea necesario para prevenir la hibridación específica al secuencia diana.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser de ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena sencilla o de cadena doble. El oligonucleótido se puede modificar en el grupo de la base, el grupo del azúcar o el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a receptores de células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular (ver, por ejemplo, Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652, 1987; Publicación de PCT No. WO88/09810) o la barrera hematoencefálica (ver, por ejemplo, publicación de PCT No. WO89/10134), agentes intercalantes (ver, por ejemplo, Zon, Pharm. Res. 5: 539-549, 1988). Para este fin, el oligonucleótido puede estar conjugado a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente transportador, agente de corte desencadenado por hibridación, etc.

Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos un grupo de base modificada. El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un grupo azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye pero no está limitado a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y hexosa. El oligonucleótido antisentido también puede contener un esqueleto semejante a péptido neutro. Tales moléculas se denominan oligómeros ácido nucleico peptídico (ANP) y se describen, por ejemplo, en Perry-O'Keefe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 14670, 1996, y en Eglom et al., Nature 365: 566, 1993.

En aún otra forma de realización, el oligonucleótido antisentido comprende al menos un esqueleto de fosfato modificado. En todavía una forma de realización más, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido alfa-anomérico.

Mientras que se pueden usar oligonucleótidos antisentido complementarios a la región codificante de la secuencia diana de ARNm, también se pueden usar aquellos complementarios a la región transcrita no traducida.

5

En algunos casos, puede ser difícil alcanzar las concentraciones intracelulares del antisentido suficientes para suprimir la traducción de los ARNms endógenos. Por lo tanto, una aproximación preferida usa una construcción de ADN recombinante en la que se coloca el oligonucleótido antisentido bajo el control de un promotor fuerte de pol III o pol

10 II.

De forma alternativa, se puede reducir la expresión del gen diana dirigiendo secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen (es decir, el promotor y/o potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que previenen la transcripción del gen en las células diana en el cuerpo (ver en general, Helene, *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569-84, 1991). En ciertas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido son morfolidos antisentido.

15

ARNip

20

Los ARN de interferencia pequeños o ARNip (siRNA en su denominación en inglés) son agentes que son capaces de inhibir la expresión de un gen diana mediante interferencia de ARN. Un ARNip se puede sintetizar químicamente, se puede obtener mediante transcripción *in vitro* o se puede sintetizar *in vivo* en la célula diana. Típicamente, los ARNip consisten en una cadena doble de ARN de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud y que puede contener una región protuberante 3' y/o 5' de 1 a 6 nucleótidos. La longitud de la región protuberante es independiente de la longitud total de la molécula de ARNip. Los ARNip actúan mediante la degradación o el silenciamiento post-transcripcional del mensajero diana.

25

30

Los ARNip de la invención son sustancialmente homólogos al ARNm del gen que codifica c-MAF o a la secuencia genómica que codifica dicha proteína. Por “sustancialmente

homólogos” se entiende que tienen una secuencia que es suficientemente complementaria o similar al ARNm diana, de forma que el ARNip sea capaz de provocar la degradación de éste por interferencia de ARN. Los ARNip adecuados para provocar dicha interferencia incluyen ARNip formados por ARN, así como ARNip que contienen distintas
 5 modificaciones químicas tales como:

- ARNip en los que los enlaces entre los nucleótidos son distintos a los que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces fosforotioato.
- conjugados de la cadena de ARN con un reactivo funcional, tal como un fluoróforo.
- Modificaciones de los extremos de las cadenas de ARN, en particular el extremo 3’
 10 mediante la modificación con distintos grupos funcionales del hidroxilo en posición 2’.
- Nucleótidos con azúcares modificados tales como restos O-alkilados en posición 2’ tales como 2’-O-metilribosa p 2’-O-fluorosibosa.
- Nucleótidos con bases modificadas tales como bases halogenadas (por ejemplo 5-
 15 bromouracilo y 5-iodouracilo), bases alquiladas (por ejemplo 7-metilguanosa).

Los ARNip pueden ser usados tal cual, es decir, en forma de un ARN de cadena doble con las características anteriormente mencionadas. Alternativamente, es posible el uso de vectores que contienen las secuencias de las cadenas sentido y antisentido de los ARNip
 20 bajo el control de promotores adecuados para su expresión en la célula de interés.

Vectores adecuados para la expresión de ARNip son aquellos en que las dos regiones de ADN que codifican para las dos cadenas del siRNA se encuentran dispuestas en tandem en una misma cadena de ADN separadas por una región separadora que, al transcribirse,
 25 forma un bucle y en donde un único promotor dirige la transcripción de la molécula de ADN que da lugar al shRNA.

Alternativamente, es posible el uso de vectores en los que cada una de las cadenas que forman el siRNA se forma a partir de la transcripción de una unidad transcripcional
 30 diferente. Estos vectores se dividen a su vez en vectores de transcripción divergente y convergente. En los vectores de transcripción divergente, las unidades transcripcionales que codifican cada una de las cadenas de ADN que forman el siRNA se encuentran

localizadas en tandem en un vector de forma que la transcripción de cada cadena de ADN depende de su propio promotor, que puede ser igual o distinto (Wang, J. et al., 2003, Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 100:5103-5106 y Lee, N.S., et al., 2002, Nat.Biotechnol., 20:500-505). En los vectores de transcripción convergente, las regiones de ADN que dan lugar al siRNA se encuentran formando las cadenas sentido y antisentido de una región de ADN que se encuentra flanqueada por dos promotores invertidos. Tras la transcripción de las cadenas de ARN sentido y antisentido, éstas formaran el híbrido para formar un siRNA funcional. Se han descrito vectores con sistemas de promotores invertidos en los que se usan 2 promotores U6 (Tran, N. et al., 2003, BMC Biotechnol., 3:21), un promotor U6 de ratón y un promotor H1 humano (Zheng, L., et al., 2004, Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 135-140 y WO2005026322) y un promotor U6 humano y un promotor H1 de ratón (Kaykas, A. y Moon, R., 2004, BMC Cell Biol., 5:16).

Promotores adecuados para su uso en la expresión de ARNip a partir de vectores de expresión convergentes o divergentes incluye cualquier promotor o pareja de promotores compatible con las células en las que se desea expresar los ARNip. Así, promotores adecuados para la realización de la presente invención incluyen, sin estar necesariamente limitados, promotores constitutivos tales como los derivados de los genomas de virus eucariotas tales como el virus del poliovirus, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de la metalotioneína, el promotor del gen de la timidina kinasa del virus del herpes simplex, regiones LTR de los retrovirus, el promotor del gen de la inmunoglobulina, el promotor del gen de la actina, el promotor del gen EF-1alpha así como promotores inducibles en los que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o de una señal exógena, tales como el sistema tetraciclina, el sistema NFkappaB/luz UV, el sistema Cre/Lox y el promotor de los genes de choque térmico, los promotores regulables de la ARN polimerasa II descritos en WO/2006/135436 así como promotores específicos de tejido ((por ejemplo, el promotor de PSA descrito en WO2006012221). En una forma de realización preferida, los promotores son promotores de la ARN polimerasa III que actúan de forma constitutiva. Los promotores de la ARN polimerasa III aparecen en un número limitado de genes tales como 5S ARN, ARNt, ARN 7SL y ARNsn U6. A diferencia de otros promotores de la ARN polimerasa III, los promotores de tipo III no requieren ninguna secuencia intragénica sino

que necesitan de secuencias en dirección 5' que comprenden una caja TATA en posiciones -34 y -24, un elemento proximal de secuencia (proximal sequence element o PSE) entre -66 y -47 y, en algunos casos, un elemento distal (distal sequence element o DSE) entre las posiciones -265 y -149. En una forma de realización preferida, los promotores de ARN polimerasa III de tipo III son los promotores de los genes H1 y U6 de origen humano o murino. En una forma de realización aún más preferida, los promotores son 2 promotores U6 de origen humano o murino, un promotor U6 de ratón y un promotor H1 humano o un promotor U6 humano y un promotor H1 de ratón. En el contexto de la presente invención, promotores especialmente adecuados y por lo tanto, especialmente preferidos para expresar de forma específica genes de interés en tumores de mama, preferiblemente, en tumores de mama ER+, son los promotores del gen ER alpha o del gen Cyclina D1.

Los ARNip pueden ser generados intracelularmente a partir de los llamados shRNA (short hairpin RNA), caracterizados por que las cadenas antiparalelas que forman el ARNip están conectadas por una región bucle u horquilla. Los shRNAs pueden estar codificados por plásmidos o virus, particularmente retrovirus y estar bajo el control de un promotor. Promotores adecuados para la expresión de shRNA son los indicados en el párrafo anterior para la expresión de ARNip.

Vectores adecuados para la expresión de ARNip y ARNsh incluyen vectores de expresión en procariontes tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCRI1, RP4, fagos y vectores "shuttle" tales como pSA3 and pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y, en particular, lentivirus) así como vectores no virales tales como pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His,

pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1. En una forma preferida de realización, los vectores son vectores lentivirales.

Los ARNip y ARNsh de la invención se pueden obtener usando una serie de técnicas conocidas para el experto en la materia. La región de la secuencia de nucleótidos que se toma como base para diseñar los ARNip no es limitante y puede contener una región de la secuencia codificante (entre el codón de iniciación y el codón de terminación) o, alternativamente, puede contener secuencias de la región no traducida 5' o 3', preferentemente de entre 25 y 50 nucleótidos de longitud y en cualquier posición en posición sentido 3' con respecto al codon de iniciación. Una forma de diseñar un ARNip implica la identificación de los motivos AA(N19)TT, en donde N puede ser cualquier nucleótido en la secuencia del gen C-MAF, y la selección de aquellos que presenten un alto contenido en G/C. Si no se encuentra dicho motivo, es posible identificar el motivo NA(N21), en donde N puede ser cualquier nucleótido.

15

ARNip específicos para c-MAF incluyen el ARNip descrito en WO2005046731, una de cuyas cadenas es ACGGCUCGAGCAGCGACAA (SEQ ID NO: 6). Otras secuencias de ARNip específicas para c-MAF incluyen, sin limitación, CUUACCAGUGUGUUCACAA (SEQ ID NO: 7), UGGAAGACUACUACUGGAUG (SEQ ID NO: 8), AUUUGCAGUCAUGGAGAACC (SEQ ID NO: 9), CAAGGAGAAAUACGAGAAGU (SEQ ID NO: 10), ACAAGGAGAAAUACGAGAAG (SEQ ID NO: 11) y ACCUGGAAGACUACUACUGG (SEQ ID NO: 12).

20

Enzimas de ADN

Por otro lado, la invención también contempla el uso de enzimas de ADN para inhibir la expresión del gen c-MAF de la invención. Las enzimas de ADN incorporan algunas de las características mecánísticas tanto de las tecnologías de antisentido como de las de ribozimas. Las enzimas de ADN se diseñan de modo que reconozcan una secuencia diana de ácido nucleico particular, parecido al oligonucleótido antisentido, sin embargo parecido a la ribozima son catalíticas y cortan específicamente el ácido nucleico diana.

30 *Ribozimas*

También se pueden usar moléculas de ribozimas diseñadas para cortar de forma catalítica transcritos de un ARNm diana para prevenir la traducción de los ARNms que codifican c-MAF cuya actividad se desea inhibir. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar el corte específico de ARN. (Para una revisión, ver, Rossi, Current
5 Biology 4: 469-471, 1994). El mecanismo de acción De la ribozima implica hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima a un ARN diana complementario, seguido por un suceso de corte endonucleolítico. La composición de las moléculas de ribozima preferiblemente incluye una o más secuencias complementarias al ARNm diana, y la bien conocida secuencia responsable del corte del ARNm o una secuencia
10 funcionalmente equivalente (ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5093246).

Las ribozimas usadas en la presente invención incluyen las ribozimas de cabeza de martillo, las ARN endorribonucleasa (de aquí en adelante “ribozimas de tipo Cech”) (Zaug et al., Science 224:574-578, 1984).

Las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (por ejemplo para
15 mejorar la estabilidad, direccionamiento, etc.) y se deberían distribuir a células que expresan el gen diana *in vivo*. Un método preferido de distribución implicar usar una construcción de ADN que “codifica” la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte de pol III ó pol II, de modo que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajeros diana endógenos e
20 inhibir la traducción. Puesto que las ribozimas, contrariamente a otras moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular menor para su eficacia.

Anticuerpos inhibidores

25 Por “anticuerpo inhibidor” se entiende en el contexto de la presente invención todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse a la proteína c-MAF de manera específica e inhibir una o más de las funciones de dicha proteína, preferiblemente las relacionadas con la transcripción. Los anticuerpos pueden ser preparados usando cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la materia, algunos de los cuales ha sido citados
30 anteriormente. Así, los anticuerpos policlonales se preparan mediante inmunización de un

animal con la proteína que se desea inhibir. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Kohler, Milstein y col. (Nature, 1975, 256: 495). Anticuerpos adecuados en el contexto de la presente invención incluyen anticuerpos intactos que comprende una región variable de unión a antígeno y una región constante, fragmentos “Fab”, “F(ab’)2” y “Fab’”, Fv, scFv, diabodies y anticuerpos biespecíficos. Una vez identificados anticuerpos con capacidad de unión a la proteína c-MAF, se seleccionarán aquellos capaces de inhibir la actividad de ésta proteína usando un ensayo de identificación de agentes inhibidores.

10 *Péptidos inhibidores*

El término “péptido inhibidor”, tal como aquí se utiliza, hace referencia a aquellos péptidos capaces de unirse a la proteína c-MAF e inhibir su actividad según se ha explicado anteriormente, es decir, impedir que c-MAF pueda activar la transcripción génica.

15

Dominantes negativos de c-MAF

Dado que las proteínas de la familia maf son capaces de homodimerizar y heterodimerizar con otros miembros de la familia AP-1, tales como Fos y Jun, una forma de inhibir la actividad de c-MAF es mediante el uso de dominantes negativos capaces de dimerizar con c-MAF pero que carecen de la capacidad de activar la transcripción. Así, dominantes negativos de c-MAF pueden ser cualquiera de las proteínas maf pequeñas que existen en la célula y que carecen de los dos tercios del extremo amino terminal que contiene el dominio de transactivación (por ejemplo, mafK, mafF, mafg y pi 8) (Fujiwara et al (1993) Oncogene 8, 2371-2380; Igarashi et al. (1995) J. Biol.Chem. 270, 7615-7624; Andrews et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11488-11492; Kataoka et al. (1995) Mol. Cell. Biol. 15, 2180-2190) (Kataoka et al. (1996) Oncogene 12, 53-62).

Alternativamente, dominantes negativos de c-MAF incluyen variantes de c-MAF que mantienen la capacidad de dimerización con otras proteínas pero que carecen de la capacidad de activar la transcripción. Estas variantes son, por ejemplo, aquellas que carecen del dominio de transactivación de c-MAF, localizado en el extremo N-terminal de la proteína. Así, variantes dominantes negativas de c-MAF incluyen, de forma ilustrativa, las variantes en las que se han eliminado al menos los aminoácidos 1 a 122 al menos los

amino ácidos 1-187 o al menos los aminoácidos 1 a 257 (considerando la numeración de c-MAF humano tal y como se describe en US6274338).

La invención contempla el uso tanto de las variantes dominantes negativas de c-MAF
5 como de los polinucleótidos que codifican c-MAF bajo control operativo de un promotor adecuado para la expresión en la célula diana. Los promotores que pueden ser usados para regular la transcripción del polinucleótido de la invención pueden ser promotores constitutivos, es decir, que dirigen la transcripción de forma basal o promotores inducibles en los que la actividad transcripcional requiere de una señal externa. Promotores
10 constitutivos adecuados para la regulación de la transcripción son, entre otros, el promotor CMV, el promotor SV40, el promotor DHFR, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor del factor de elongación 1a (EFla), el promotor de albúmina, el promotor de ApoA1, el promotor de queratina, el promotor de CD3, el promotor de las cadenas pesada o ligera de la inmunoglobulina, el promotor de neurofilamento, el promotor
15 de la enolasa específica de neuronas, el promotor L7, el promotor CD2, el promotor de la quinasa de la cadena ligera de miosina, el promotor del gen HOX, el promotor de la timidina quinasa, el promotor de la RNA Polimerasa II, el promotor del gen MyoD, el promotor del gen de la fosfogliceroquinasa (PGK), el promotor de la lipoproteína de baja densidad (LDL), el promotor del gen de actina. En una forma preferida de realización, el
20 promotor que regula la expresión del transactivador es el promotor del gen de PGK. En una forma preferida de realización, el promotor que regula la transcripción del polinucleótido de la invención es el promotor de la RNA polimerasa del fago T7.

Preferiblemente, los promotores inducibles que pueden ser usados en el contexto de la
25 presente invención son aquellos que responden a un agente inductor, que muestran una expresión basal nula o despreciable en ausencia de agente inductor y que son capaces de promover la activación del gen localizado en posición 3'. En función del tipo de agente inductor, los promotores inducibles se clasifican en promotores Tet on/off (Gossen, M. y H. Bujard (1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89:5547-5551; Gossen, M. et al., 1995, Science
30 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. y H.M. Blau, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456); promotores Pip on/off (US6287813); promotores dependientes de antiprogesterin (US2004132086), promotores dependientes de ecdisona (Christopherson et al., 1992,

Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89:6314-6318; No et al., 1996, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 93:3346-3351, Suhr et al., 1998, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 95:7999-8004 y WO9738117), un promotor dependiente de metalotioneina (WO8604920) y promotores dependientes de rapamicina (Rivera et al., 1996, Nat.Med. 2:1028-32).

5

Vectores adecuados para la expresión del polinucleótido que codifica la variante dominante negativa de c-MAF incluyen vectores derivados de vectores de expresión en procariotas tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCRI1, RP4, fagos y vectores “shuttle” tales como pSA3 and pAT28, 10 vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en 15 células eucariotas superiores bien basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y, en particular, lentivirus) así como vectores no virales tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1.

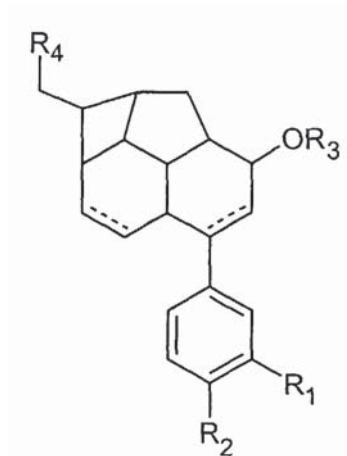
20

Otros compuestos inhibidores de la actividad de la proteína c-MAF

Otros compuestos inhibidores de c-MAF adecuados para su uso en la presente invención incluyen:

25

Derivados del ácido endiátrico H tales como los descritos en WO2008014888 y que corresponden a la fórmula general



donde

R₁ y R₂ son, independientemente el uno del otro,

1.0 H 0

2.0 un grupo -O-alquilo C₁-C₆, -O-alquenilo C₂-C₆, -O-alquinilo C₂-C₆ u -O-arilo C₆-C₁₀, en el cual alquilo, alquenilo y alquinilo son de cadena lineal o ramificados, y en el que los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo están mono- o disustituidos con:

I

2.1 -OH,

2.2 =O,

2.3 -O-alquilo C₁-C₆, en el cual alquilo es de cadena lineal o ramificado,

2.4 -O-alquenilo C₂-C₆, en el cual alquenilo es de cadena lineal o ramificado,

2.5 -arilo C₆-C₁₀,

2.6 -NH -alquilo C₁-C₆, en el cual alquilo es de cadena lineal o ramificado,

2.7 -NH-alquenilo C₂-C₆, en el cual alquenilo es de cadena lineal o ramificado,

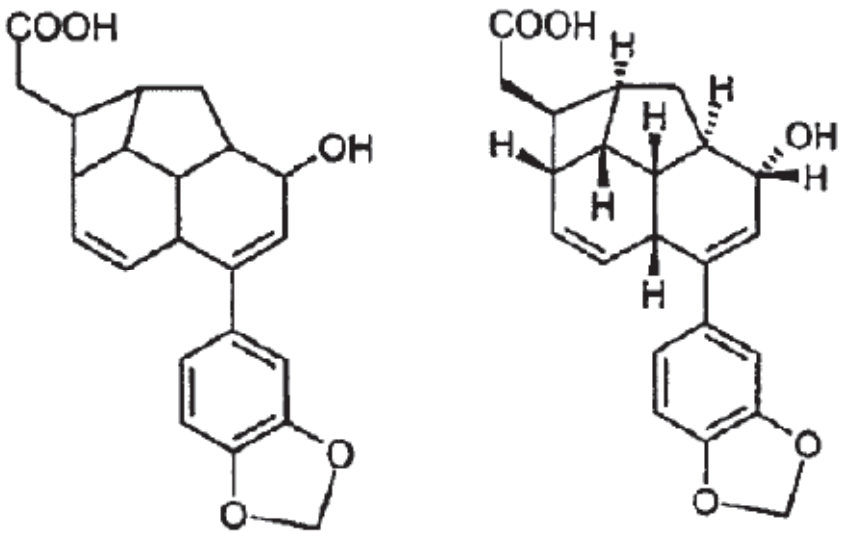
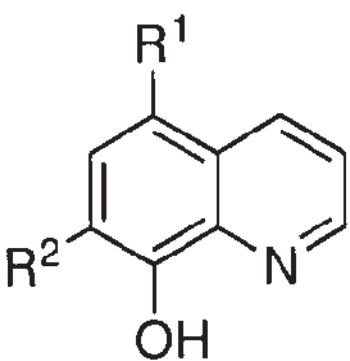
2.8 -NH₂ o

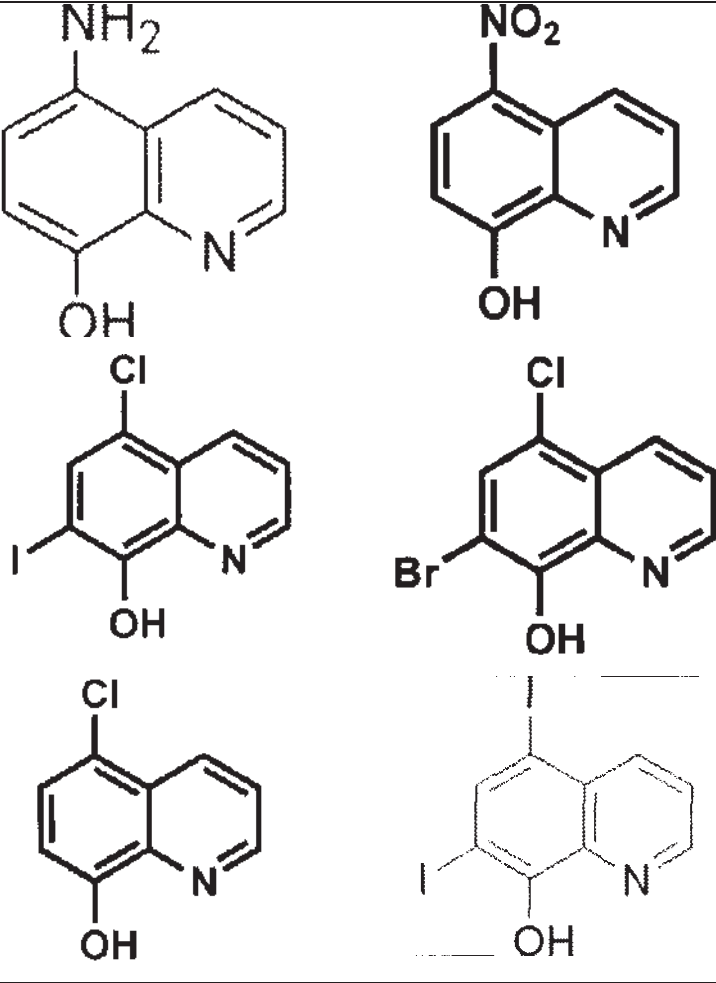
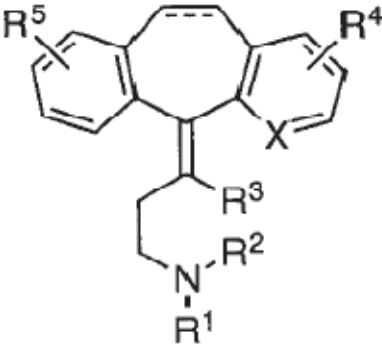
2.9 halógeno,

y en el que el grupo arilo, eventualmente está mono- o disustituido con el sustituyente 2.1 ó 2.3 a 2.9,

en el cual los sustituyentes 2.3, 2.4, 2.6 y 2.7 pueden estar sustituidos adicionalmente con funciones -CN, -amida u -oxima, y 2.5 puede estar sustituido adicionalmente con funciones -CN o amida, o R₁ y R₂ juntos forman un anillo, en donde R₁ y R₂ significan un grupo -O-[alquilen (C₁-C₆)]-O-,

<p>R₃ es</p> <p>1.0 H o</p> <p>2.0 un grupo -O-alquilo C₁-C₆ , -O-alquenilo C₂-C₆, -O-alquinilo C₂-C₆ u -O-arilo C₆-C₁₀, en el cual alquilo, alquenilo y alquinilo son de cadena lineal o ramificados, y en el que los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo están mono- o disustituidos con:</p> <p>2.1 -OH,</p> <p>2.2 =O,</p> <p>2.3 -O-alquilo C₁-C₆ , en el cual alquilo es de cadena lineal o ramificado,</p> <p>2.4 -O-alquenilo C₂-C₆ , en el cual alquenilo es de cadena lineal o ramificado,</p> <p>2.5 -arilo C₆-C₁₀,</p> <p>2.6 -NH -alquilo C₁-C₆ , en el cual alquilo es de cadena lineal o ramificado,</p> <p>2.7 -NH-alquenilo C₂-C₆, en el cual alquenilo es de cadena lineal o ramificado,</p> <p>2.8 -NH₂ o</p> <p>2.9 halógeno,</p> <p>y en el que el grupo arilo, eventualmente está mono- o disustituido con el sustituyente 2.1 ó 2.3 a 2.9,</p> <p>en el cual los sustituyentes 2.3, 2.4, 2.6 Y 2.7 pueden estar sustituidos adicionalmente con funciones -CN, -amida u -oxima, y 2.5 puede estar sustituido adicionalmente con funciones -CN o amida</p> <p>R₄ es CO₂R₃, CO₂NHR₃, CHO, CH₂OR₃, CH₂OSi(R₃)₃, CH₂Br, CH₂CN, en los cuales R₃ es tal como se ha definido arriba</p> <p>Y, en particular, los compuestos</p>
--

	
II	<p>Derivados de 8-hidroxiquinolinas tales como los descritos en WO2009146546 de fórmula general</p>  <p>donde</p> <p>R₁ se selecciona del grupo de NO₂, NH₂, NH(C₁₋₆alquil) and N(C₁₋₆alquil)(C₁₋₆alquil);</p> <p>R₂ se selecciona de H, halógeno, C₁₋₆ alquilo y C₁₋₆ alquilo sustituidos con flúor,</p> <p>o</p> <p>R₁ es Cl y R₂ es Br o H</p> <p>y, preferiblemente, los compuestos</p>

	
III	Clioquinol (5-cloro-7-yodoquinolin-8-ol) tal y como se describe en WO09049410
IV	<p>Compuestos tales como los descritos en WO08098351 de fórmula general</p>  <p>Donde</p> <p>==--:--: es un enlace sencillo o doble</p>

	<p>R1 se selecciona del grupo de H, C1-4alquilo, C(O)OC1-4alquilo, C(O)C1-4alquilo y C(O)NHC1-4alquilo;</p> <p>R2 se selecciona de H y C1-4alquilo;</p> <p>R3 se selecciona de H y C1-4alquilo;</p> <p>o R2 y R3 se encuentran unidos junta con el átomo de carbon y de nitrógeno al que se encuentran unidos para formar un anillo de piperidina,</p> <p>R4 and R5 se seleccionan independientemente de H, halogeno, hidroxilo, C1-4alquilo, C1-4alquilo sustutuido por fluor y C1-4alcoxi; y</p> <p>X se selecciona de C y N.</p> <p>y compuestos preferidos tales como</p> <p>Ciproheptadina (4-(5H-dibenzo[a,d]cicloheptan-S-ilideno)-1-metilpiperidina)</p> <p>Amitryptilina (3-(10,11-dihidro-5H-dibenzo[[a,d]]cycloheptene-5-ilideno)-N, N-dimetil-1-propanamina)</p> <p>Loratadina (etil-4-(8-cloro-S,6-dihidro-11H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridin-11-ilidino)-1-piperidincarboxilato)</p> <p>Ciclobenzapina (3-(5H-dibenzo[a,d]cycloheptan-5-ilideno)-N,N-dimetil-1-propanamina)</p>
V	Nivalenol (12,13-Epoxi-3,4,7,15-tetrahidroxitrichotec-9-en-8-ona) tal y como se describe en WO0359249

Tabla 1: Pequeñas moléculas con capacidad de inhibir c-MAF

Otros inhibidores de c-MAF se describen en la solicitud de patente WO2005063252, tal como se muestra en la tabla siguiente (Tabla 2).

Antagonista	Referencia para la actividad inhibidora cdk2
Análogos de Purina Purvalanoles tales como 2-(1R-isopropil-2-hidroxi-etilamino)-6-(3-cloroanilino)-9-isopropilpurina que tiene una fórmula molecular $C_{19}H_{26}ClN_6O$ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca Purvalanol A (#P4484, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), Purvalanol B, aminopurvalanol, compuesto 52 (en donde el isopropilo de purvalanol A se reemplaza con H)	Gray, N.S. <i>et al.</i> , Science, 281, 533-538 (1998); Chang, Y.T. <i>et al.</i> , Chem. Biol. 6, 361-375 (1999).
2-(hidroxi-etilamino)-6-bencilamino-9-metilpurina que tiene una fórmula molecular $C_{15}H_{18}N_6O$ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca Olomoucine (#00886), 2-(2'-Hidroxi-etilamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina que tiene una fórmula molecular $C_{17}H_{22}N_6O$ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca N ⁶ -isopropylolomoucine (#10763); CVT-313	Vesely, J., <i>et al.</i> (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86, 11; Brooks, E. E., <i>et al.</i> (1997) J. Biol. Chem., 272, 29207-11
6-(Bencilamino)-2(R)-[1-(hidroximetil)propil]amino-9-isopropilpurina 2-(R)-[[9-(1-metiletil)-6-[[fenilmetil]amino]-9H-purin-2-il]amino]-1-butanol que tiene una fórmula molecular de $C_{19}H_{26}N_6O$ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca Roscovitine (#R7772), metoxiroscovitina	Wang, D. <i>et al.</i> , J. Virol., 75, 7266-7279 (2001); McClue, S.J. <i>et al.</i> , Int. J. Cancer, 102, 463-468 (2002); Meije, L., <i>et al.</i> , (1997) Eur. J. Biochem., 243, 527-36
Análogo de purina N2-(cis-2-aminociclohexil)-N6-(3-clorofenil)-9-etil-9H-purin-2,6-diamina que tiene una fórmula molecular de $C_{19}H_{24}ClN_7$ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca CGP74514 (#C3353)	Imbach, P. <i>et al.</i> , Bioorg. Med. Chem., Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K., <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).

CGP79807, un análogo de purina de CGP74514 (supra) en donde Cl se reemplaza con CN, OH se remueve, y la posición orto del anillo ciclohexano es NH ₂	Imbach, P. <i>et al.</i> , <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 9, 91-95 (1999); Dreyer, M.K. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 44, 524-530 (2001).
Análogo de purina tal como O6-ciclohexilmetil guanina NU2058	Arris, C.E. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 43, 2797-2804 (2000);
	Davies <i>et al.</i> , <i>Nature Structural Biology</i> , 9:10, 745-749, 2002
Análogo de Purina tal como NU6102	Arris, C.E. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 43, 2797-2804 (2000); Davies, T.G. <i>et al.</i> , <i>Nat. Struct. Biol.</i> , 9, 745-749 (2002).
Isopentenil-adenina	Vesely, J., <i>et al.</i> , (1994) <i>Eur. J. Biochem.</i> , 224, 771-86
Agentes sin base en Purina	
Indirubinas tales como indirubin-3'-monoxima que tiene una fórmula molecular de C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₂ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca (#10404), 5-sulfonato de indirubina, 5-cloro indirubina	Davies, T.G. <i>et al.</i> , <i>Structure</i> , 9, 389-397 (2001); Marko, D. <i>et al.</i> , <i>Br. J. Cancer</i> , 84, 283-289 (2001); Hoessel, R., <i>et al.</i> , (1999) <i>Nat Cell Biol.</i> , 1, 60-7; PCT/US02/30059 a Hellberg <i>et al.</i> , publicada como WO 03/027275.
Oxindol 1 de Fischer como referencia en la columna 2 de esta tabla (#N118, JMAR Chemical,	Poros-Makkay, M., <i>et al.</i> , <i>Tetrahedron</i> 2000, 56, 5893; <i>Org. Process Res. Dev.</i> 2000, 4, 10
Indenopirazoles	Nugiel, D.A. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 44, 1334-1338 (2001); Nugiel, D.A. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 45, 5224-5232 (2002); Yue, E.W. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 45, 5233-5248 (2002)
Pirido(2,3-d)pirimidin-7-onas, compuesto 3 de Fischer	Barvian, M. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 43, 4606-4616 (2000); Toogood, P.L., <i>Med. Res. Rev.</i> , 21, 487-498 (2001)
Quinazolininas tales como anilinoquinazolina	Sielecki, T.M. <i>et al.</i> , <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 11, 1157-1160 (2001); Metthey <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> 2003, 46, 222-236.
Tiazoles tales como tiazol combinado 4-[[[(7-oxo-6,7-dihidro-8H-[1,3]tiazol[5,4-e]indol-8-iliden)metil]amino]-N-(2-piridil)bensensulfonamida que tiene una fórmula molecular de C ₂₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S ₂ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca GW8510 (#G7791)	Davis, S.T. <i>et al.</i> , <i>Science</i> , 291, 134-137 (2001); PCT/US02/30059 para Hellberg <i>et al.</i> , publicada como WO 03/027275.
Flavopiridoles tales como flavopiridol (L86 8275; NCS 649890, National Cancer Institute, Bethesda, MD) y un derivado de decoloro	Carlson, B.A., <i>et al.</i> , (1996) <i>Cancer Res.</i> , 56, 2973-8.
Alcaloides tales como Estaurosporina (#S1016, A.G. Scientific, San Diego, CA) o UCN-01 (7-hidroxiestaurosporina) National Cancer Institute, Bethesda, MD	Rialet, V., <i>et al.</i> , (1991) <i>Anticancer Res.</i> , 11, 1581-90; Wang, Q., <i>et al.</i> , (1995) <i>Cell Growth Differ.</i> , 5, 927-36; Akiyama, T., <i>et al.</i> , (1997) <i>Cancer Res.</i> , 57, 1495-501; Kawakami, K., <i>et al.</i> , (1996) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 219, 778-83
Paulonas tales como 9-Bromo-7,12-dihidro-indol[3,2-d][1]benzacepin-6(5H)-ona que tiene una fórmula molecular de C ₁₆ H ₁₁ BrN ₂ O disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca kenpaulone (#K3888) o 9-Nitro-7,12-dihidroindol-[3,2-d][1]benzacepin-6(5)ona que tiene una fórmula molecular de C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₃ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca alsterpaulone (#A4847)	Zaharevitz, D.W. <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , 59, 2566-2569 (1999); Schultz, C., <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 42, 2909-2919 (1999); Zaharevitz, D.W., <i>et al.</i> , (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59, 2566-9; PCT/US02/30059 para Hellberg <i>et al.</i> , publicada como WO 03/027275.
CGP 41251, un alcaloide	Begemann, M., <i>et al.</i> , (1998) <i>Anticancer Res.</i>

	18, 2275-82; Fabbro <i>et al.</i> , <i>Pharmacol Ther.</i> 1999 May-Jun; 82 (2-3): 293-301.
Himnialdisinas tales como 10z-himnialdisina que tiene una fórmula molecular de $C_{11}H_{10}BrN_5O_2$ disponible de Eiochemicals.net, una división de A.G. Scientific, Inc. (San Diego, CA) (H-1150)	Meijer, L., <i>et al.</i> , (1999) <i>Chemistry & Biology</i> , 7, 51-63; PCT/US02/30059 para Iellberg <i>et al.</i> , publicada como WC 03/027275.
CGP60474, una fenilaminopirimidina	21; WO95/09853, Zimmermann <i>et al.</i> , septiembre 21 de 1994
Tiazolopirimidina 2	Attaby <i>et al.</i> , <i>Z. Naturforsch</i> 54b, 788-798 (1999)
Diarilurea	Horman, T. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 44, 4628-4640 (2001), Honma, T. <i>et al.</i> , <i>J. Mec. Chem.</i> , 44, 4615-4627 (2001).
Metiléster del ácido (2R)-2,5-dihidro-4-hidroxi-2-[(4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)fenil)metil]3-(4-hidroxi)fenil)-5-oxo-2-furancarboxílico que tiene una fórmula molecular de $C_{24}H_{24}O_7$ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca Eutyrolactone-1 (B7930)	Kitagawa, M. <i>et al.</i> , <i>Oncogene</i> , 8, 2425-2432 (1993).
Aloisine A, Cat. No. 128125 (Calbiochem, San Diego, CA)	Metey, <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> 2003, 46, 222-236.

Tabla 2: inhibidores de c-MAF

En una forma preferida de realización, los agentes inhibidores de c-MAF se usan para el
 5 tratamiento y/o prevención de la metástasis a hueso. En una forma de realización aún más preferida, la metástasis en hueso es metástasis osteolítica.

Los agentes inhibidores de c-MAF se administran típicamente en combinación con un
 vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

El término "vehículo" se refiere a un diluyente o excipiente con el que se administra el
 principio activo. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como
 agua y aceites, incluyendo aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales
 como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se
 15 emplean preferiblemente como vehículos agua o disoluciones acuosas de solución salina y
 disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para las disoluciones
 inyectables. Vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's
 Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin, 1995. Preferiblemente, los vehículos de la
 invención están aprobados por la agencia reguladora de un gobierno de estado o el federal

o están enumerados en la Farmacopea Estadounidense u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

Los vehículos y las sustancias auxiliares necesarios para fabricar la forma farmacéutica deseada de administración de la composición farmacéutica de la invención dependerán, entre otros factores, de la forma farmacéutica de administración elegida. Dichas formas farmacéuticas de administración de la composición farmacéutica se fabricarán según métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica. Una revisión de diferentes métodos de administración de principios activos, excipientes que van a usarse y procedimientos para producirlos pueden encontrarse en “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993. Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (disoluciones, suspensiones o emulsiones) para la administración oral, tópica o parenteral. Además, la composición farmacéutica puede contener según sea necesario estabilizadores, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares.

Para uso en medicina, los agentes inhibidores de c-MAF pueden encontrarse en forma de prodroga, sal, solvato o clatrato, bien de forma aislada o bien en combinación con agentes activos adicionales y pueden ser formuladas conjuntamente con un excipiente que sea aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (por ejemplo comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas etc.), líquida (por ejemplo soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo, sin ser limitante, oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo,

Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000). Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones
5 aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

En el caso de que se administren ácidos nucleicos (ARNip, polinucleótidos que codifican
10 ARNip o shARN o polinucleótidos que codifican dominantes negativos de c-MAF) la invención contempla composiciones farmacéuticas especialmente preparadas para la administración de dichos ácidos nucleicos. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender dichos ácidos nucleicos en forma desnuda, es decir, en ausencia de compuestos que protejan a los ácidos nucleicos de su degradación por las nucleasas del
15 organismo, lo que conlleva la ventaja de que se elimina la toxicidad asociada a los reactivos usados para la transfección. Rutas de administración adecuadas para los compuestos desnudos incluyen intravascular, intratumoral, intracraneal, intraperitoneal, intraesplénica, intramuscular, subretinal, subcutánea, mucosa, tópica y oral (Templeton, 2002, DNA Cell Biol., 21:857-867). Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden
20 administrarse formando parte de liposomas, conjugados a colesterol o conjugados a compuestos capaces de promover la translocación a través de membranas celulares tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex, oligómeros de arginina y péptidos tales como los descritos en
25 WO07069090 (Lindgren, A. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci, 21:99-103, Schwarze, S.R. et al. , 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:45-48, Lundberg, M et al., 2003, Mol Therapy 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, Pharm. Res. 21:389-393). Alternativamente, el polinucleótido puede administrarse formando parte de un vector plasmídico o de un vector viral, preferiblemente vectores basados en adenovirus, en virus
30 adenoasociados o en retrovirus, tales como virus basados en el virus de la leucemia murina (MLV) o en lentivirus (HIV, FIV, EIAV).

Los agentes inhibidores de c-MAF o las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser administradas en dosis de menos de 10 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente menos de 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005 ó 0,00001 mg por cada kg de peso corporal. La dosis unitaria se puede administrar
5 por inyección, por inhalación o por administración tópica.

La dosis depende de la severidad y respuesta de la condición a tratar y puede variar entre varios días y varios meses o hasta que se observe que la condición remite. La dosificación óptima se puede determinar realizando mediciones periódicas de las concentraciones de
10 agente en el organismo del paciente. La dosis óptima se puede determinar a partir de los valores de EC50 obtenidos mediante ensayos previos *in vitro* o *in vivo* en modelos animales. La dosis unitaria se puede administrar una vez al día o menos de una vez al día, preferiblemente, menos de una vez cada 2, 4, 8 o 30 días. Alternativamente, es posible administrar una dosis inicial seguida de una o varias dosis de mantenimiento, generalmente
15 de menos cantidad que la dosis inicial. El régimen de mantenimiento puede implicar tratar al paciente con dosis que oscilan entre 0,01 µg y 1,4 mg/kg de peso corporal por día, por ejemplo 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, o 0,00001 mg por kg de peso corporal por día. Las dosis de mantenimiento se administran, preferiblemente, como mucho una vez cada 5, 10 ó 30 días. El tratamiento se debe continuar durante un tiempo que variará según el tipo de alteración
20 que sufra el paciente, su severidad y el estado del paciente. Tras el tratamiento, se debe monitorizar la evolución del paciente para determinar si se debe incrementar la dosis en caso de que la enfermedad no responda al tratamiento o se disminuye la dosis si se observa una mejora de la enfermedad o si se observan efectos secundarios indeseados.

25 REACTIVOS DE LA INVENCION

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un reactivo para cuantificar los niveles de expresión del gen c-MAF para diagnosticar y/o pronosticar metástasis en un sujeto que padece cáncer de mama ER+ o para diseñar una terapia personalizada a un
30 sujeto afectado de cáncer de mama ER+.

En una realización particular, el reactivo para cuantificar los niveles de expresión del gen c-MAF es un ácido nucleico que hibrida con la secuencia de nucleótidos del gen c-MAF o un anticuerpo, o un fragmento del mismo capaz de detectar un antígeno, capaz de unirse específicamente a la proteína codificada por el gen c-MAF o cualquier variante de dicha proteína. Ácidos nucleicos capaces de hibridar con el gen c-MAF y anticuerpos capaces de unirse a la proteína c-MAF han sido descritos previamente.

Los reactivos para su uso en la presente invención se pueden encontrar formando parte de un kit. Por “kit” se entiende, en el contexto de la presente invención, un producto que contiene los diferentes reactivos para detectar los niveles de expresión del gen c-MAF empaquetados para permitir su transporte y almacenamiento. Materiales adecuados para el empaquetado de los componentes del kit incluyen cristal, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobres y similares. Adicionalmente, los kits pueden contener instrucciones para el empleo de los distintos componentes que se encuentran en el kit. Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico capaz de almacenar instrucciones de forma que puedan ser leídas por un sujeto, tales como medios de almacenamiento electrónicos (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Adicional o alternativamente, los medios pueden contener direcciones de Internet que proporcionen dichas instrucciones.

El siguiente ejemplo simplemente ilustra la invención y no pretende ser limitativo del alcance de la misma.

25

EJEMPLO

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelos experimentales de estudio

30

Se han desarrollado nuevos modelos experimentales para el estudio de la metástasis en cáncer de mama ER+. Con este fin se ha utilizado una línea celular humana de cáncer de

mama ER+, denominada MCF7, la cual se transfectó de forma estable con un vector que permite la expresión de la GFP/Luciferasa. Esta línea celular se inoculó en ratones inmunodeficientes (Balb-c/nude) por inyección vía intraventricular o en la vena caudal para poder seleccionar células con capacidad metastática en distintos órganos. Los ratones
5 llevaron implantes subcutáneos de estrógenos que garantizaron la presencia de esta hormona durante todo el experimento.

Selección de poblaciones metastáticas

10 Las poblaciones metastáticas a diferentes tejidos se seleccionaron mediante la identificación y aislamiento de las células de las lesiones metastáticas. Para ello, se usaron técnicas de imagen por bioluminiscencia utilizando la tecnología que permite detectar el establecimiento y crecimiento de células tumorales en órganos de interés a distintos
15 tiempos y cuantificar el número de células tumorales presentes. Para la aplicación de esta técnica, las células fueron transducidas para expresar el gen de la luciferasa y la GFP, y con ellos se llevó a cabo su seguimiento *in vivo* en tiempo real con métodos no invasivos. La captura de imagen de luminiscencia (actividad luciferasa) se realizó con el animal en condiciones de anestesia, utilizando un equipo tipo Xenogen IVIS y el software livingimage como metodología preferida debido a su sensibilidad y velocidad. Para aislar
20 las células metastáticas, se diseccionó la lesión tumoral y, posteriormente, mediante técnicas de citometría por barrido con láser por fluorescencia (GFP), se aislaron las células metastáticas de las propias del organismo. Una vez aisladas estas células se repitió el proceso para enriquecer su tropismo por los distintos tejidos. Mediante estos procedimientos, se aislaron distintas poblaciones metastáticas con especificidad de tejido
25 incluyendo metástasis a hueso.

Una vez identificadas y aisladas las poblaciones metastáticas se realizó un análisis transcripcional de alto rendimiento. En conjunto, esta estrategia permitió identificar genes cuya transcripción se ve incrementada y algunos, que actúan como mediadores del proceso
30 metastático en células cancerosas con mala prognosis. La implicación de los genes cuya expresión se encuentra alterada en la colonización por parte de las células metastáticas en

tejidos y órganos concretos fue confirmada mediante un procedimiento de selección *in vivo* no sesgado.

Identificación del grupo de genes enriquecidos en metástasis a hueso en cáncer de mama

5 ER+

Mediante comparación de los perfiles de expresión génica de las subpoblaciones celulares alta y pobremente metastáticas, se identificó un grupo de genes cuya sobreexpresión o represión está asociada a un fenotipo osteolítico de metástasis al hueso. Las lesiones metastáticas osteolíticas a hueso (degradación), a diferencia de las osteoblásticas (síntesis),
10 están asociadas a formas de cáncer de mama metastático a hueso clínicamente más agresivas. Los perfiles de expresión asociados a las líneas celulares con alta capacidad metastática a hueso, se obtuvieron usando métodos estandarizados. Los distintos derivados metastáticos a hueso procedentes de células mamarias ER+ se clasificaron, a través de un
15 análisis no sesgado, con respecto a su fenotipo de agresividad a hueso y su perfil de expresión. En ambos casos las líneas celulares metastáticas derivadas, BoM1 y BoM2, demostraron tener un comportamiento metastático distinto al de las células de partida (MCF7), tanto a nivel del perfil de expresión génica así como fenotípicamente (Figura 1).

20 El grupo de genes enriquecido para metástasis a hueso en cáncer de mama ER+ incluye citoquinas, moléculas de adhesión celular, proteasas de membrana, mediadores de señalización y factores de transcripción.

A continuación el grupo de genes seleccionado como candidatos a regular la capacidad de
25 metástasis a hueso en cáncer de mama ER+ se sometió a validación clínica en humanos. Para ello, se compararon los cambios de expresión de los genes candidatos con aquellos que ocurren en los perfiles de expresión génica de dos cohortes, una de tumores primarios de mama y la otra de metástasis, que incluyen 560 y 46 tumores de mama y metástasis respectivamente.

30

RESULTADOS

Selección de genes relevantes

El análisis realizado indicó que son 91 los genes enriquecidos o silenciados en las líneas celulares metastáticas a hueso derivadas de la línea celular ER+ MCF7 (Figura 1B). Los genes y funciones determinantes de forma individual fueron seleccionados para un estudio más detallado siguiendo los siguientes criterios:

- i) Correlación clínica con cáncer de mama ER+ agresivo y metástasis al hueso.
- ii) Funciones conocidas anteriormente por participar en procesos compatibles con un fenotipo agresivo (p.e. Reabsorción de los huesos, Inflamación, Angiogénesis),
- 10 iii) Variaciones en el nivel de expresión entre las poblaciones metastáticas frente a las parentales tal y como se ha descrito anteriormente, y
- iv) Rol central en las redes de regulación génica y las vías de señalización celular

Basándose en estos criterios, se identificó el factor de transcripción c-MAF y se comprobó cómo sus variaciones en los niveles de expresión predicen recurrencia a hueso en tumores primarios de cáncer de mama ER+.

Relevancia clínica y valor pronóstico de los genes enriquecidos para metástasis a hueso:

20 Los genes enriquecidos en las metástasis a hueso mediante el sistema experimental de selección de poblaciones celulares metastáticas aquí desarrollado se evaluaron frente a dos bases de datos distintas que contenían los perfiles de expresión y las anotaciones clínicas de 560 tumores primarios de cáncer de mama y 46 metástasis de pacientes con cáncer de mama. Estos tumores son representativos de todos los subtipos de cáncer de mama y localización de metástasis. Ambas bases de datos y sus anotaciones clínicas son accesibles públicamente (GSE 2603, 2034, 12276 y 14020). La expresión génica de los genes de metástasis a hueso se correlacionó con los parámetros clínicos incluida la recurrencia y la metástasis (Figuras 1C, D y E).

30 Bioinformática y biología computacional

Para obtener los grupos de genes enriquecidos en metástasis y verificar su correlación clínica se usaron paquetes estadísticos R y Bioconductor. Las funciones y estructuras

específicas para el tratamiento de los datos fueron importadas y son de acceso público abierto a través de www.bioconductor.org.

Prueba de concepto experimental

5

Validación funcional in vivo de los genes metastáticos tejido específicos

El gen metastático c-MAF, que resultó positivo en el análisis, fue validado funcionalmente en un ensayo de colonización metastática a hueso en un modelo experimental xenógrafo de metástasis de cáncer de mama en ratones.

10

Las aproximaciones realizadas para validar nuestro gen candidato a dirigir el proceso de metástasis fueron ensayos de pérdida y ganancia de función. Con este fin, el gen c-MAF fue expresado o silenciado en las células parentales o en las células derivadas altamente metastáticos para hueso y posteriormente su capacidad metastásica a hueso fue evaluada *in vivo*.

15

Ensayos de ganancia de función

Para expresar el gen c-MAF se utilizaron sistemas lentivirales para inducir la expresión heteróloga del gen candidato en las células tumorales parentales y aquellas seleccionadas con baja capacidad metastática. La capacidad inductora de metástasis del gen c-MAF fue determinada mediante técnicas de seguimiento por bioluminiscencia de las células metastáticas inoculadas en el ratón por vía intracardíaca (como se describe en el apartado “modelos experimentales de estudio”). En todos los casos, se inyectaron en paralelo las correspondientes células control infectadas con vectores lentivirales que no expresaban la proteína c-MAF en una cohorte paralela de animales como control negativo.

20

25

Ensayos de pérdida de función

30

La expresión del gen c-MAF fue suprimida en la línea celular BoM2 altamente metastática a hueso y que presenta elevados niveles de expresión del gen c-MAF endógeno (Figura 2).

Con este fin se utilizó un vector lentiviral que permitía la expresión de un ARN de interferencia (ARNip) con capacidad para reducir la expresión del gen c-MAF en un 80% en relación a los niveles presentes en la línea celular BoM2. Esta población celular con la expresión del gen c-MAF silenciada fue inoculada por vía intracardíaca (como se describe en el apartado “modelos experimentales de estudio”) en ratones inmunodeprimidos siendo estos animales monitorizados para detectar actividad metastática mediante técnicas de imagen por bioluminiscencia. En estos experimentos se usó como control negativo células obtenidas a partir de la línea Bom2 por infección con un vector lentiviral que codifica para un ARNip que actúa eficazmente contra la expresión de otro gen que es irrelevante para el proceso metastático.

CONCLUSIONES

c-MAF es un marcador pronóstico y un gen diana causal en procesos de metástasis en cáncer de mama ER+, en particular, en metástasis a hueso de cáncer de mama ER+. Esta conclusión se apoya por los datos de validación clínica y los experimentos de ganancia y pérdida de función aquí desarrollados.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para diagnosticar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+ y/o para pronosticar la propensión a desarrollar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+ que comprende
5 (i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tejido tumoral de dicho sujeto y
(ii) comparar el nivel de expresión previamente obtenido con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra control,
10 en donde si los niveles de expresión de dicho gen están incrementados respecto los niveles de expresión de dicho gen en la muestra control, entonces dicho sujeto presenta un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor propensión a desarrollar una metástasis.
- 15 2. Método según la reivindicaciones 1, en donde la muestra control es una muestra de tejido tumoral de cáncer de mama ER+ de un sujeto que no ha sufrido metástasis.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la cuantificación de los niveles de expresión del gen c-MAF comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dicho gen, o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario (ADNc) de dicho gen, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.
20
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cuantificación de los niveles de expresión se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o un array de ADN o ARN.
25
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la cuantificación de los niveles de expresión del gen c-MAF comprende la cuantificación de los niveles de proteína codificada por dicho gen o de una variante de la misma.
30
6. Método según la reivindicación 5, en donde la cuantificación de los niveles de proteína se realiza mediante western blot, ELISA o un array de proteínas.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la metástasis es metástasis en hueso.
8. Método según la reivindicación 7 en donde la metástasis en hueso es metástasis osteolítica.
9. Uso de un agente inhibidor de c-MAF en la elaboración de un medicamento para en el tratamiento y/o la prevención de la metástasis de cáncer de mama ER+.
10. 10. Uso según la reivindicación 9, en donde el agente inhibidor de c-MAF se selecciona del grupo formado por un ARNip específico para c-MAF, un oligonucleótido antisentido específico para c-MAF, una ribozima específica para c-MAF, un anticuerpo inhibidor de c-MAF, una variante de c-MAF dominante negativa y un compuesto de la tabla 1 o de la tabla 2.
11. 11. Uso según la reivindicación 9 en donde la metástasis es metástasis en hueso.
12. 12. Uso según la reivindicación 11 en donde la metástasis en hueso es metástasis osteolítica.
13. 13. Uso de un reactivo capaz de cuantificar los niveles de expresión del gen c-MAF para diagnosticar y/o pronosticar metástasis en un sujeto que padece cáncer de mama ER+ o para diseñar una terapia personalizada a un sujeto afectado de cáncer de mama ER+.
14. 14. Uso según la reivindicación 13, en donde el reactivo para cuantificar los niveles de expresión del gen c-MAF es un ácido nucleico que hibrida con la secuencia de nucleótidos del gen c-MAF o un anticuerpo, o un fragmento del mismo capaz de detectar un antígeno, capaz de unirse específicamente a la proteína codificada por el gen c-MAF o cualquier variante de dicha proteína.
15. 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14 en donde la metástasis es metástasis en hueso.

16. Uso según la reivindicación 15 en donde la metástasis en hueso es metástasis osteolítica.

A

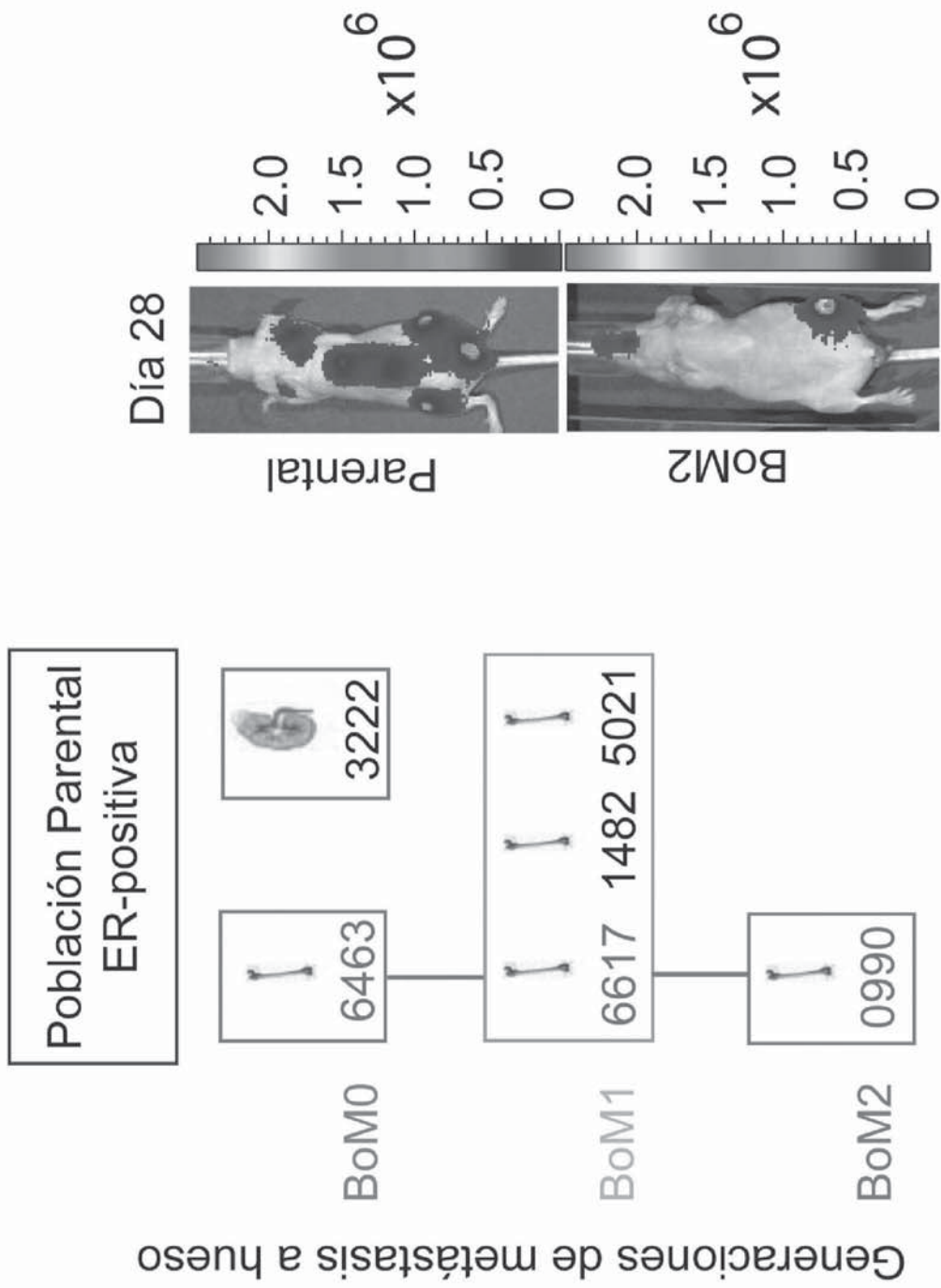


FIG. 1A

B

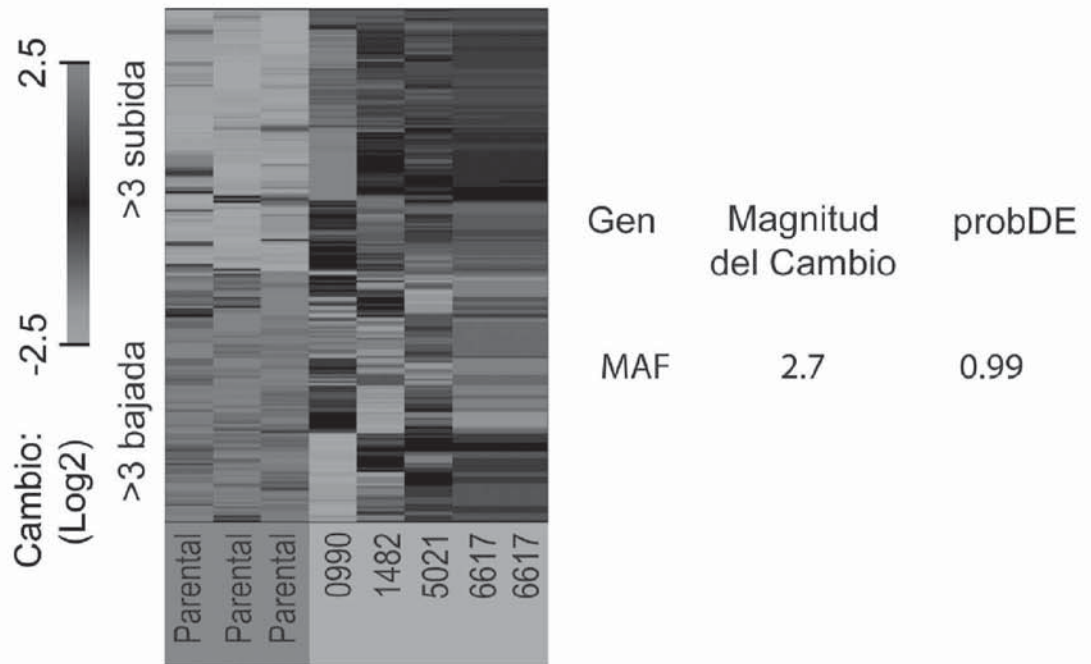


FIG. 1B

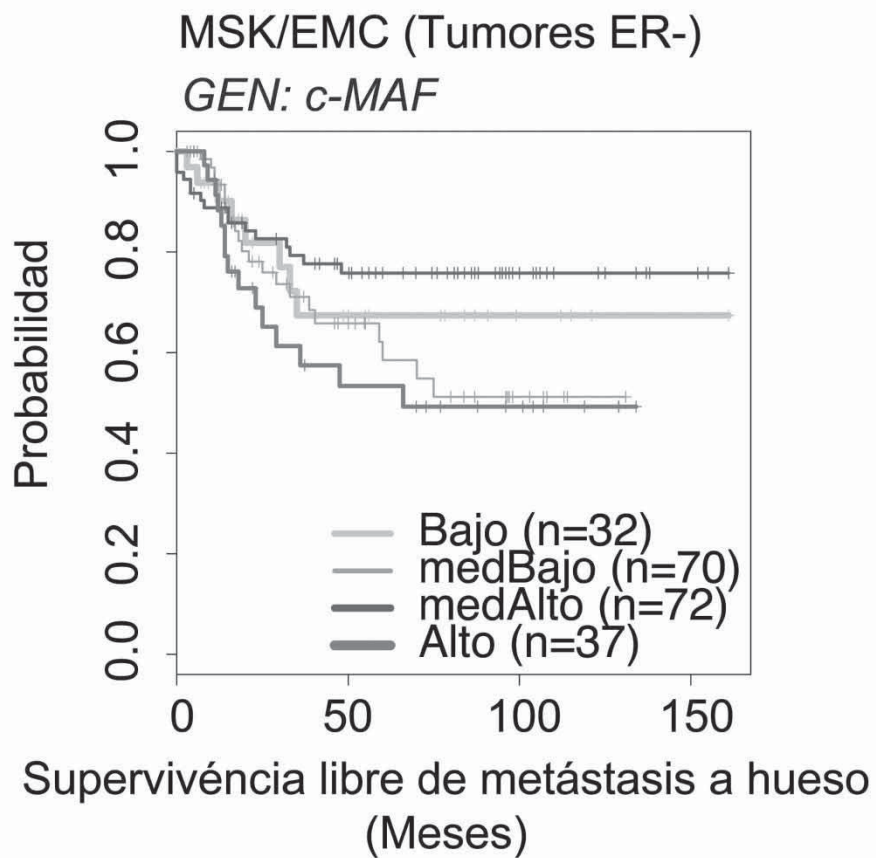
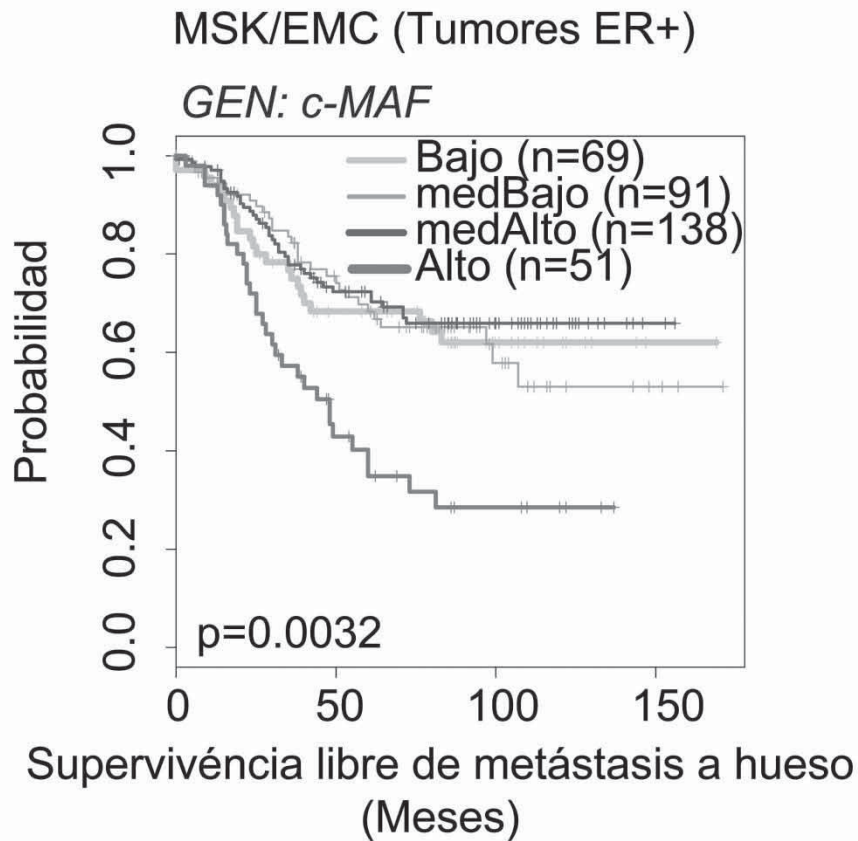


FIG. 1C

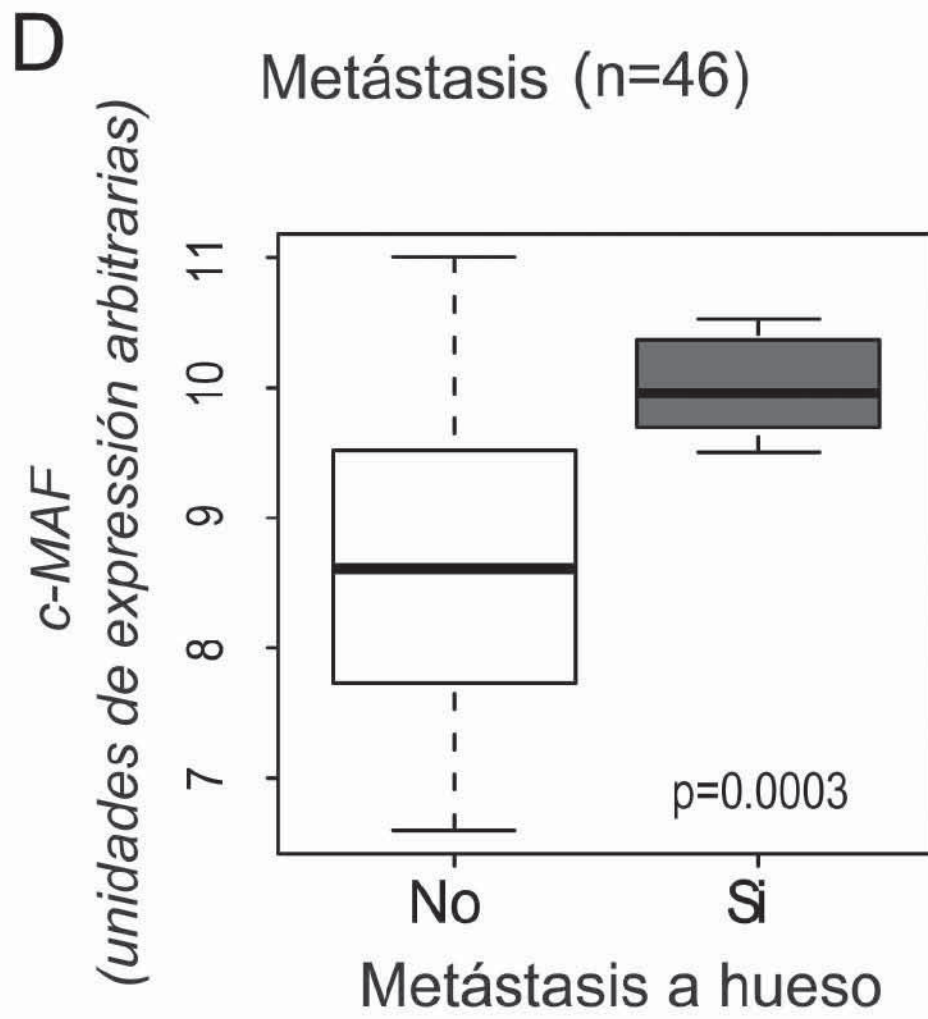


FIG. 1D

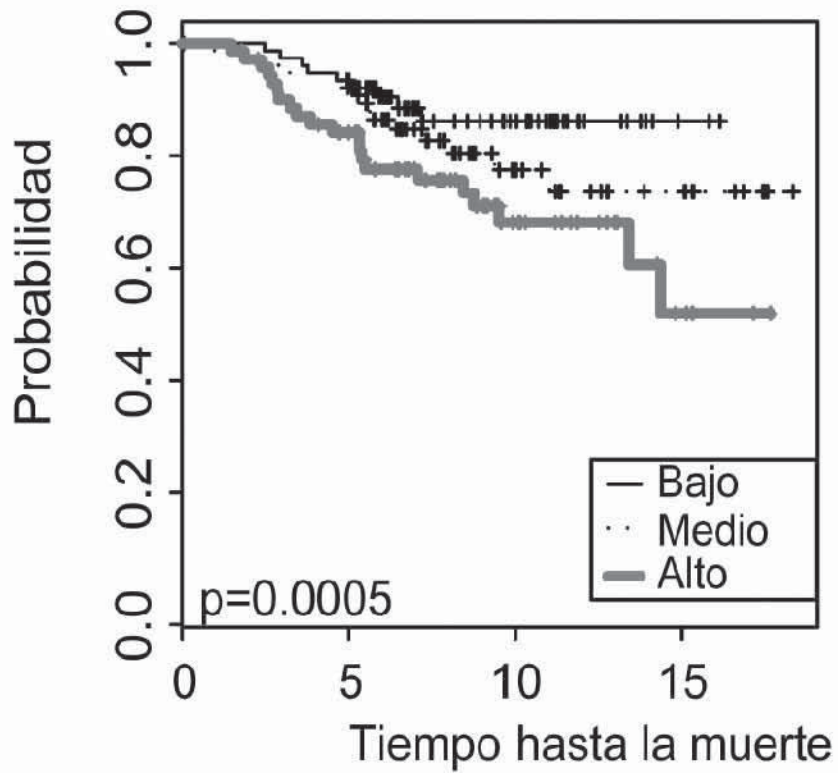
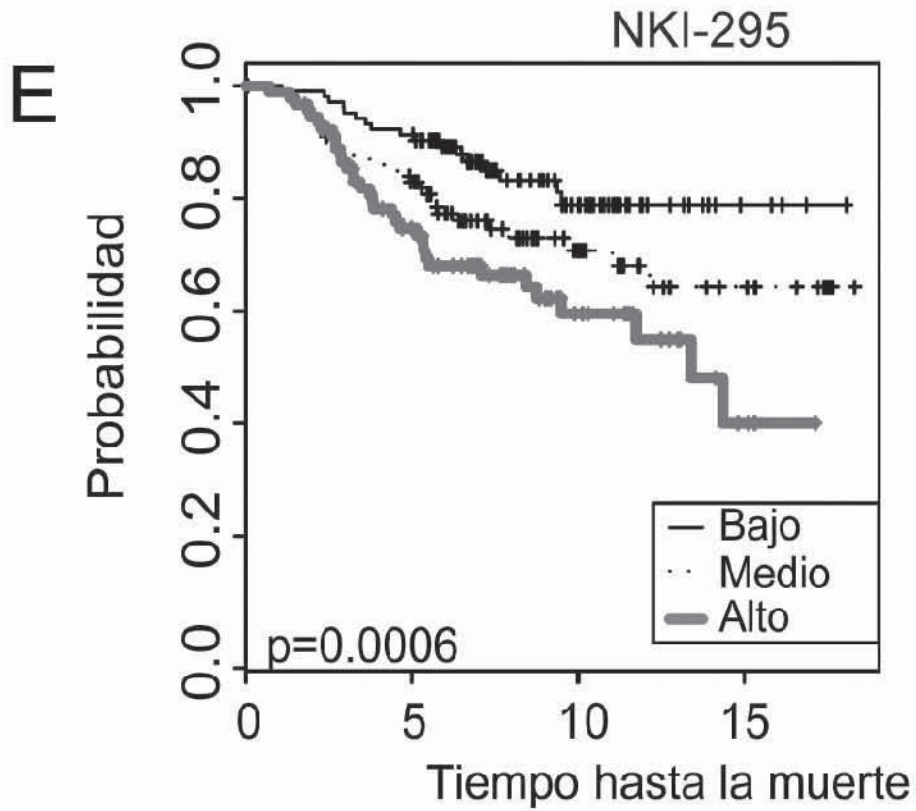


FIG. 1E

A

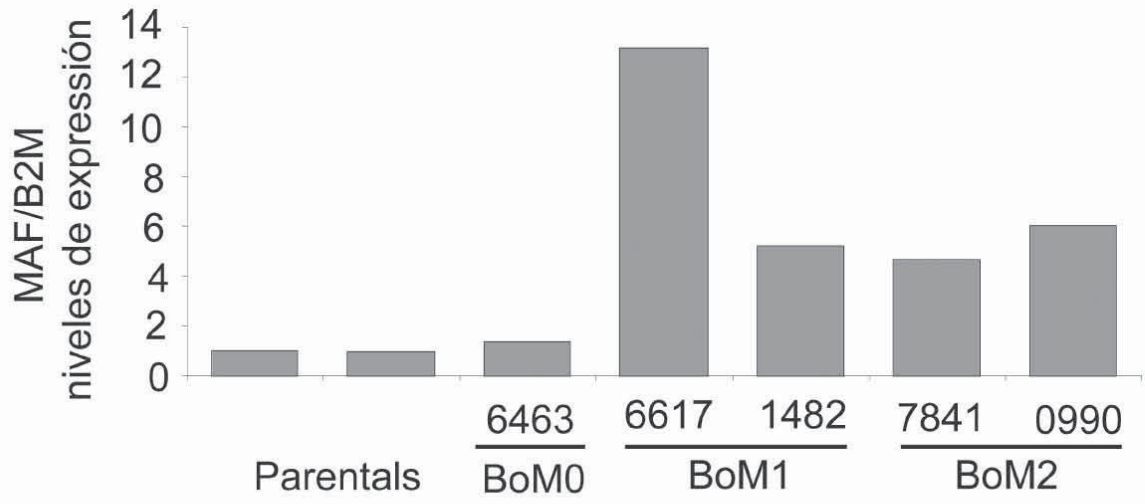


FIG. 2A

B

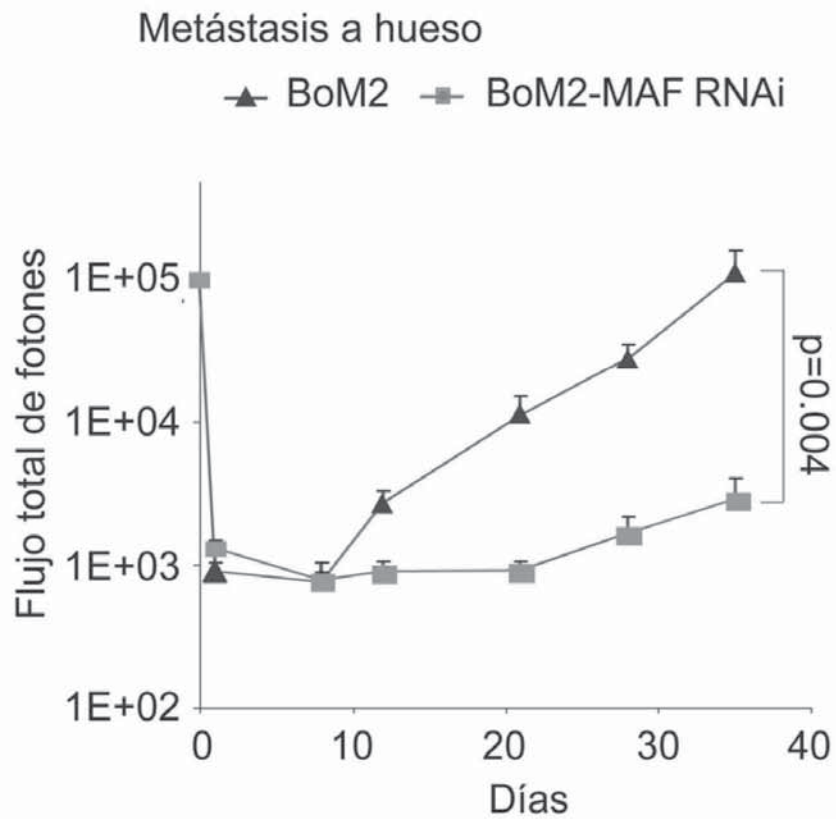
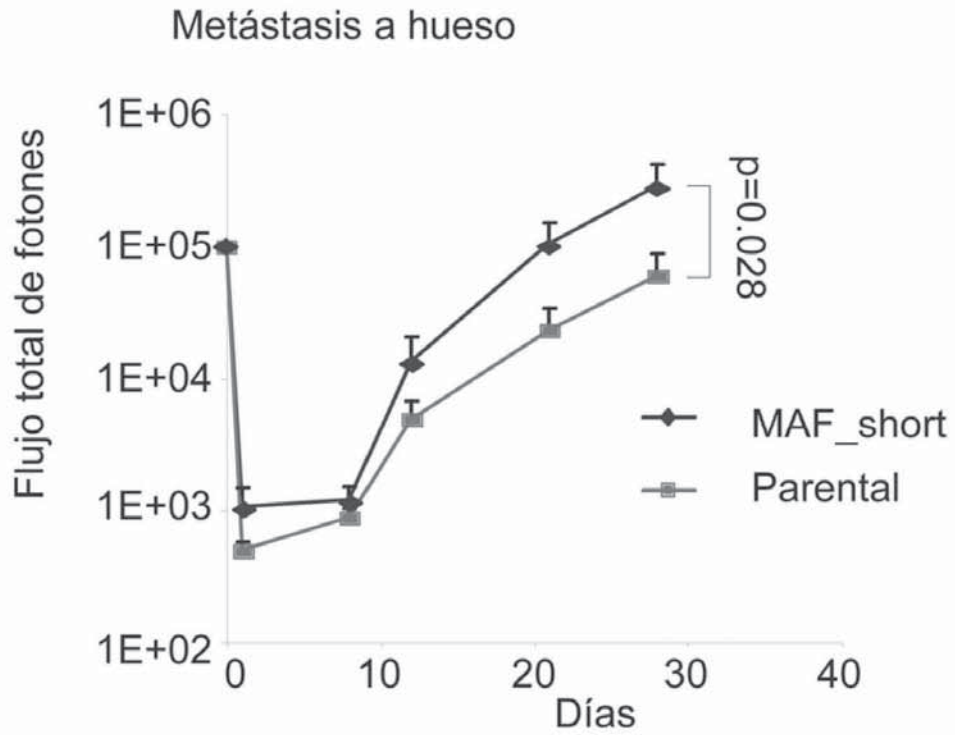


FIG. 2B

C

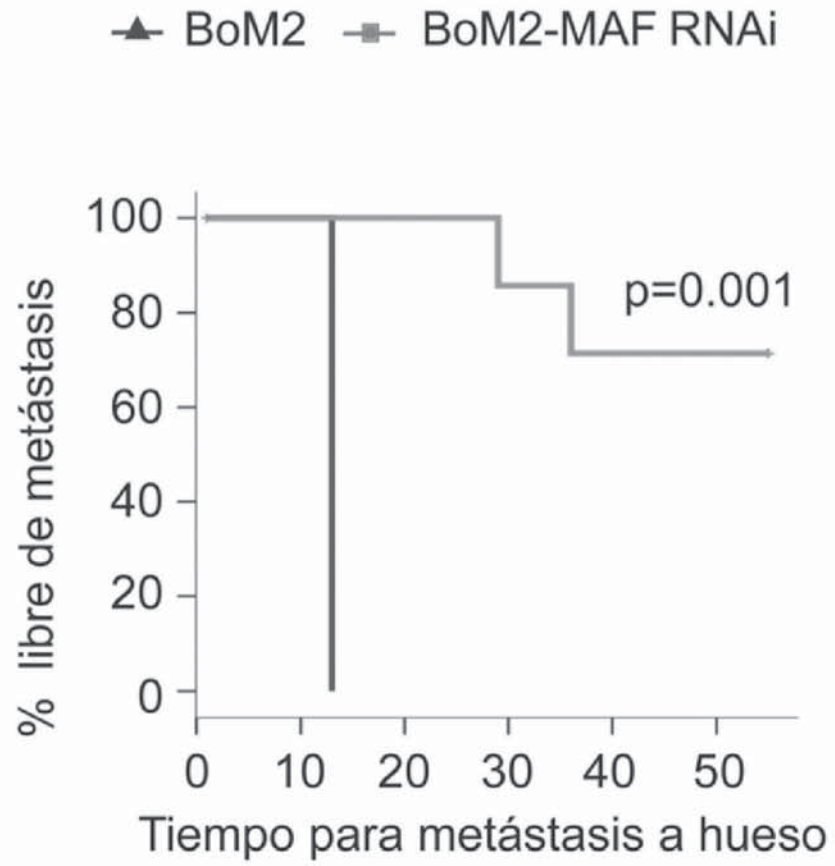


FIG. 2C



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031478

②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.10.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 1961825 A1 (INSERM, INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 27.08.2008, todo el documento.	1-16
A	KANG Y., et al. "A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone." <i>Cancer Cell</i> (2003) Vol. 3 páginas 537-549. Todo el documento.	1-16
A	GIANCOTTI V. "Breast cancer markers." <i>Cancer Letters</i> (2006) Vol. 243, páginas 145-159. Páginas 145-146 y 151.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
01.02.2012

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.02.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 1961825 A1 (INSERM, INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MEDICALE)	27.08.2008
D02	KANG Y., et al. "A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone." <i>Cancer Cell</i> (2003) Vol.3 páginas 537-549. Todo el documento.	2003
D03	GIANCOTTI V. "Breast cancer markers." <i>Cancer Letters</i> (2006) Vol. 243, páginas 145-159. Páginas 145-146 y 151.	2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un método *in vitro* para diagnosticar y/ o pronosticar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+ que comprende cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tejido tumoral de dicho sujeto y comparar el nivel de expresión previamente obtenido con el de una muestra control, en donde si los niveles de expresión de dicho gen están incrementados con respecto a la muestra control, entonces dicho sujeto presenta un diagnóstico positivo (reivindicaciones 1-8).

La presente solicitud de invención también consiste en el uso de un agente inhibidor de c-MAF en la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la metástasis del cáncer de mama ER+ (reivindicaciones 9-16).

El documento D01 se considera el más próximo al estado de la técnica al objeto de las reivindicaciones 1-16, y divulga un método de diagnóstico de metástasis de hueso, de pulmón y de cerebro en un sujeto afectado por cáncer de mama, donde se cuantifica el nivel de expresión de un marcador seleccionado de una lista de marcadores donde se encuentra v-Maf para el diagnóstico de metástasis de hueso, y se compara con una muestra control (ver todo el documento).

El documento D02 divulga una investigación sobre las bases moleculares de la metástasis ósea osteolítica en el cáncer de mama humano a través de líneas celulares con actividad metastásica elevada y la validación de los genes que están sobreexpresados en dichas células (ver todo el documento).

El documento D02 no menciona la sobreexpresión del gen c-Maf para el diagnóstico o pronóstico de metástasis ósea en pacientes con cáncer de mama.

El documento D03 divulga que c-Maf es un coactivador del complejo estrógeno-receptor de estrógeno, al igual que otros miembros de la familia de proteínas AP1, como Fra-1 o Jun-B. Se ha demostrado que la proteína Fra-1 se expresa en altos niveles en los carcinomas de tiroides, y podría ser considerado como un marcador del fenotipo agresivo de cáncer de mama (ver páginas 145-146 y 151).

1.-NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).

1.1.-Reivindicaciones 1-16

La invención reivindicada difiere principalmente de los documentos D01-D03 en que ninguno de los documentos citados muestra el uso de c-Maf como marcador para el diagnóstico o pronóstico de metástasis óseas en pacientes con cáncer de mama.

Aunque en los documentos D01-D03 se divulga el uso de genes que codifican para las proteínas de la familia de proteínas activadoras AP-1, familia a la que pertenece C-Maf, no se considera obvio que se utilice este gen como marcador de la misma forma que v-Maf, Jun-B o Fra-1.

Así, la invención reivindicada en los reivindicaciones 1-16 es, con referencia a los documentos D01-D03, nueva y se considera que implica actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.