

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 450**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2014 PCT/US2014/010724**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14110163**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2014 E 14702128 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2943505**

54 Título: **Regulación de MELK para el tratamiento de cáncer de mama**

30 Prioridad:

11.01.2013 US 201361751703 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2018

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (50.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH y
DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**HUANG, XIZHONG;
ZHAO, JEAN, J.;
MIN, JUNXIA y
WANG, YUBAO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 669 450 T3

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

DESCRIPCIÓN

Regulación de MELK para el tratamiento de cáncer de mama

5 Antecedentes de la invención

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea con un alto grado de diversidad en histología, respuesta terapéutica y desenlaces del tratamiento de pacientes. Los análisis del perfilado transcripcional han identificado reproduciblemente al menos cinco subtipos "intrínsecos" principales de cáncer de mama: cáncer de mama de tipo mama normal, luminal A, luminal B, enriquecido en HER2/Neu y de tipo basal (BBC) (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001). Estos subtipos moleculares han sido confirmados recientemente en una caracterización completa de tumores de mama humanos a los niveles genómico, epigenético, transcriptómico y proteómico (Koboldt et al., 2012). Entre estos subtipos, el cáncer de mama de tipo basal (BBC) está fuertemente asociado a un fenotipo agresivo y mal pronóstico (Foulkes et al. 2010; Perou 2011). A diferencia de sus homólogos luminales, las células de BBC carecen de expresión del receptor de estrógeno (ER) y receptor de progesterona (PR), y así se solapan en gran medida con los cánceres de mama "triples negativos" (CMTN) clínicamente definidos, que también se caracterizan por la ausencia de expresión de ER/PR (Foulkes et al. 2010; Perou 2011). La ausencia de estas dianas moleculares convierte las células de BBC o CMTN en relativamente insensibles a terapias dirigidas que son altamente eficaces en el tratamiento de cáncer de mama luminal. El establecer la patogénesis molecular de este subtipo e identificar posibles dianas para el tratamiento sigue siendo un reto clave para BBC/CMTN.

Las cinasas representan una población única de genes que están frecuentemente implicados en la patogénesis tumoral. De hecho, se ha observado un gran número de mutaciones, alteraciones en el número de copias y/o en el nivel de expresión en muchas cinasas a través de múltiples tipos de cánceres humanos. Además, las cinasas también son farmacológicamente manejables, haciendo la inhibición de la actividad de cinasas, tal como mediante moléculas pequeñas, una estrategia altamente eficaz para el tratamiento de cáncer (Zhang et al., 2009). Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad de identificación de cinasa(s) críticas para la expresión de células negativas para ER/PR de un modo que se eluciden dianas "quimiomodulables" para estrategias de tratamiento a largo plazo eficaces para cánceres de mama de expresión de ER/PR negativa, para nuevos métodos de identificación de pacientes que es probable que se beneficien de las estrategias de tratamiento, y para métodos para tratar pacientes con las estrategias de tratamiento a largo plazo eficaces.

Chung et al. (Oncotarget Jan 2012, vol. 3, N.º 12, 1 de diciembre de 2012, páginas 1629-1640) describieron el cribado de alto rendimiento de una biblioteca de compuestos e identificaron un inhibidor de MELK, OTSSP167.

El documento WO 2004/070062 identifica genes de cáncer que se expresan diferencialmente en al menos dos tipos de tejidos de cáncer.

G. Bianchini et al. (Cancer Research, vol. 70, N.º 21, 1 de noviembre de 2010, páginas 8852-8862) describieron la expresión en exceso de 12 proteínas cinasas en cánceres receptor de estrógeno (ER) positivo/receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) negativo, 7 en HER2⁺ y 28 en ER⁻/HER2⁻.

Se evaluaron las implicaciones de pronóstico y terapéuticas de distintos patrones de expresión de cinasas en diferentes subtipos de cáncer de mama.

Sumario de la invención

Los presentes inventores describen en el presente documento métodos de inhibición del crecimiento o proliferación de células de cáncer de mama. Los métodos incluyen administrar a un sujeto en necesidad de los mismos en una cantidad que es eficaz para inhibir el crecimiento o la proliferación de las células de cáncer de mama un inhibidor de MELK, en el que las células de cáncer de mama son receptor de estrógeno (ER) negativo. En algunos aspectos, los métodos incluyen administrar a un sujeto en necesidad del mismo en una cantidad que es eficaz para inhibir el crecimiento o la proliferación de las células de cáncer de mama un inhibidor de FoxM1, en el que las células de cáncer de mama son receptor de estrógeno (ER) negativo. Los presentes inventores describen métodos que incluyen administrar a un sujeto en necesidad del mismo en una cantidad que es eficaz para inhibir el crecimiento o la proliferación de las células de cáncer de mama un inhibidor de MELK, un inhibidor de FoxM1 o un inhibidor de MELK y un inhibidor de FoxM1, en el que las células de cáncer de mama son receptor de estrógeno (ER) negativo.

La presente invención también se refiere a una cantidad eficaz de un inhibidor de MELK, comprendiendo el inhibidor de MELK una ARNhp que tiene una secuencia de nucleótidos diana de MELK seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 1, SEQ. ID. NO: 2, SEQ. ID. NO: 3, SEQ. ID. NO: 4 y combinaciones de las mismas; para su uso en un sujeto en necesidad del mismo para inhibir el crecimiento o la proliferación de células de cáncer de mama; en el que las células de cáncer de mama son receptor de estrógeno (ER) negativo y receptor de progesterona (PR) negativo.

Otro aspecto de la presente invención incluye un método de identificación de sujetos que tienen cáncer probablemente para beneficiarse de un tratamiento con un inhibidor de MELK, o un inhibidor de FoxM1. El método incluye determinar un estado de expresión de receptor de estrógeno y expresión de receptor de progesterona en células de cáncer de mama del sujeto. El método también incluye identificar el sujeto que tiene células de cáncer de mama que son receptor de estrógeno negativo y receptor de progesterona negativo. El sujeto que tiene células de cáncer de mama receptor de estrógeno negativo y receptor de progesterona negativo indica una necesidad de tratamiento del sujeto con un inhibidor de MELK, un inhibidor de FoxM1 o un inhibidor de MELK y un inhibidor de FoxM1 y en el que el inhibidor de MELK comprende un ARNhp que tiene una secuencia de nucleótidos diana de MELK seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4 y combinaciones de las mismas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un cribado genético *in vivo* que identifica MELK como un posible oncogén.

(A) Desarrollo de un modelo de tumorigénesis *in vivo*. El número de tumores formados y el número de inyecciones se describieron en la tabla izquierda. Obsérvese que en células epiteliales mamarias humanas (HMEC), se requirieron dos oncogenes para que las células lograran la tumorigénesis *in vivo*. Mostrando la imagen derecha de ratones tumores formados en células HMEC-DD-NeuT transducidas con PIK3CA (H1047R). (B) Esquema del cribado genético para genes que promueven la formación de tumores. Se transdujo un conjunto de retroviral de cinasa miristoilada (37 conjuntos totales, cada uno que consiste en 10-12 marcos de lectura abiertos únicos) en células HMEC-DD-ErbB2. Las células se trasplantaron entonces en panículos adiposos mamarios de ratones sin pelo. Se recogieron los tumores generados de 12 conjuntos de células, seguido de la extracción de ADN genómico. El ADN genómico de células antes del trasplante y de tumores se sometió a qPCR. El enriquecimiento relativo derivó de las diferencias de números de Ct. Entre veintiséis genes identificados, MELK está altamente enriquecido en el tumor desarrollado.

La Figura 2 ilustra veintiséis cinasas que estuvieron específicamente enriquecidas durante el desarrollo de tumores. (A) Lista de resultados positivos del cribado y su enriquecimiento en veces relativo en los tumores *in vivo*. El umbral para el enriquecimiento en veces se fija a 10. (B) Lista de resultados positivos del cribado y su descripción de genes.

La Figura 3 ilustra que MELK es un gen expresado en exceso de alto nivel en cáncer de mama y tiene sorprendente valor pronóstico.

(A) MELK se expresa en exceso en cáncer de mama. Se analizó la expresión de MELK entre mamas normales (n=61) y carcinoma de mama ductal invasivo (n=392) en una cohorte de cáncer de mama TCGA (Koboldt et al., 2012). Cada círculo representa una muestra individual. Líneas negras en cada grupo indican la mediana con el intervalo intercuartílico. Se obtuvo el valor de p de la prueba de la t de Student bilateral. Obsérvese que el valor de p para la expresión en exceso de MELK en mamas malignas con respecto a normales se clasifica el 29° de entre aquellos de los 20.423 genes totales medidos. (B) La expresión de MELK se correlaciona con el grado histológico de cáncer de mama. La expresión de MELK se comparó entre tumores de mama de diferente grado histológico. Las líneas negras en cada grupo indican la mediana con intervalo intercuartílico. Se calculó el valor de p con análisis unilaterial de la varianza (ANOVA). Obsérvese que el valor de p para la correlación entre la expresión de MELK y el grado de enfermedad se clasifica el 3° (cohorte de Hatzis) y 8° (cohorte de Desmedt) entre aquellos de los 12.624 genes totales medidos, y el 7° (cohorte de Bittner) entre aquellos de los 19.574 genes totales medidos. (C) Análisis de supervivencia global de Kaplan-Meier en tres cohortes de pacientes con cáncer de mama independientes. Las muestras se dividieron en dos grupos, aquellos con alta (el 60 % superior) y aquellos con baja (el 40 % inferior) expresión de MELK. Se obtuvieron valores de p de la prueba del orden logarítmico, se calculó la razón de riesgo (HR) usando la versión de GraphPad Prism. (D) Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia sin metástasis en tres cohortes de pacientes con cáncer de mama independientes. Las muestras se dividieron como en (C). Se muestran valores de p del orden logarítmico y razones de riesgo (HR). (E) Expresión de MELK más alta en cáncer de mama de tipo basal. Se clasificaron las muestras en cada cohorte en cinco subtipos moleculares distintos usando PAM50 (Parker et al., 2009). Las líneas negras en cada grupo indican la mediana con intervalo intercuartílico. *** $p < 0,0001$. * $p < 0,05$. (F) Correlación inversa entre la expresión de MELK y la del receptor de estrógeno (ER, o ESR1). Cada círculo representa una muestra de tumor de mama humano individual (n=295). El análisis de correlación se realizó por GraphPad Prism. Todos los datos de expresión génica se descargaron de Oncomine (Rhodes et al., 2004), y se analizaron. Los artículos originales para los conjuntos de datos citados se enumeran en la Tabla S1 más adelante.

La Figura 4 ilustra que MELK es un gen expresado en exceso de alto nivel en cáncer de mama y tiene fuerte valor pronóstico

(A) MELK se expresa a un nivel más alto en tumores de mama que en tejidos de mama normales. (B) La expresión de MELK está positivamente correlacionada con el grado histológico de la enfermedad. Los valores de p indicados se clasifican el 7° (de los 19.574 genes totales medidos, cohorte de Bittner) y 3° (de los 12.624 genes totales medidos, cohorte de Hatzis). (C) La expresión de MELK predice la metástasis. Las muestras en las cohortes indicadas se dividieron en grupos de MELK alto y MELK bajo, que representan el 60 % superior y el 40 % inferior en el orden descendente de expresión de MELK. Se muestran curvas de Kaplan-Meier, con valores de p de orden logarítmico y razones de riesgo (HR). (D) La alta expresión de MELK predice menor supervivencia global de pacientes con cáncer de mama. Las muestras se agruparon en MELK alto y bajo como en (D). Se obtuvieron valor de p de la prueba del orden logarítmico, se calculó la razón de riesgo (HR) usando

GraphPad Prism. (E) Expresión de MELK en subtipos de cáncer de mama que se definen por la pauta de expresión génica. Las muestras se dividieron en subtipos basados en el distintivo del gen PAM50 (Parker et al., 2009). "ns" indica no significativo. "*****" $p < 0,0001$. (F) Correlación inversa entre la expresión de MELK y la del receptor de estrógeno (ER, o ESR1). (G) El cáncer de mama triple negativo presenta expresión de MELK más alta que otros subtipos. Los pacientes se clasificaron en grupos con subtipos de enfermedades basados en la expresión del receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), o factor 2 de crecimiento epidérmico (HER2) humano. Todos los datos se descargaron de Oncomine (Rhodes et al., 2004), y se reanalizaron. Las líneas negras en cada panel (A, B, E, F) indican la mediana con intervalo intercuartílico.

La Figura 5 ilustra que la expresión de MELK en exceso confiere potencial tumorigénico.

(A) MELK no mutante, cuando se expresa en exceso, es oncogénico. Se transdujeron células HMEC-DD-NeuT con vector vacío, MELK miristoilada o no mutante. Las células se trasplantaron en panículos adiposos mamarios de ratones sin pelo. El número de tumores formado y el número de inyecciones se describieron en la tabla. (B) Expresión en exceso de MELK en células Rat1-DD-TP53. Las células se introdujeron establemente con GFP (como control negativo), o MELK humana no mutante, o un alelo oncogénico de p110 α (H1047R). La expresión ectópica de estos genes es conducida por la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney. Obsérvese que la expresión de p110 α (H1047R) potencia la fosforilación de Akt. β -tubulina sirve de control de carga. (C) Ensayo de formación de colonias en agar blando. Se sembraron las células indicadas en placa de 12 pocillos a la densidad de 4000 célula por pocillo. Las placas se recogieron después de 3 semanas. El panel superior muestra imágenes de campo brillante representativas de las colonias. El inferior indica análisis cuantitativo de la formación de colonias, que se muestra como el número total de colonias por pocillo. EV indica vector vacío. *** $p < 0,001$. (D) La expresión en exceso de MELK conduce a la formación de tumores. Se trasplantaron las células indicadas a ratones inmunodeprimidos, y se recogieron tumores subcutáneos después de tres semanas. El panel superior e inferior respectivamente indican las imágenes de tumores y la cuantificación del peso del tumor. *** $p < 0,001$. (E) Expresión en exceso de MELK no mutante e inactiva para cinasas en células Rat1-DD-TP53. Se introdujeron establemente células con vector vacío (EV) pWzI o MELK marcado con Flag que aloja pWzI, que expresan MELK humana conducida por la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney. (F) La expresión en exceso de MELK inactiva para cinasa no confiere crecimiento celular independiente del anclaje. Los ensayos de formación de colonias se hicieron como en (C). Los paneles izquierdo y derecho muestran las imágenes de campo brillante representativas de las colonias y el análisis cuantitativo, respectivamente. *** $p < 0,001$. (G) La expresión en exceso de MELK catalíticamente inactiva no induce el crecimiento tumoral. Se realizaron xenoinjertos subcutáneos como en (E). El panel izquierdo y derecho muestra imágenes de tumores y cuantificación del peso del tumor, respectivamente. *** $p < 0,001$.

La Figura 6 demuestra que MELK es necesario para la proliferación de células de cáncer de mama de tipo basales.

(A) Líneas de células de cáncer de mama basales tienen niveles de expresión más altos de MELK que las células cancerosas luminales. Los datos de ARNm de MELK entre las 16 líneas de células de cáncer de mama basales establecidas y 20 luminales fueron del conjunto de datos de Neve (Neve et al., 2006). La línea negra de cada grupo representa la media \pm EEM. Se calculó el valor de p por la prueba de la t de Student. (B) La abundancia de proteína de MELK es más alta en células de cáncer de mama basales que en luminales. Se sometieron lisados de las células indicadas a inmunotransferencia. Se usó α -tubulina como control de carga. (C) Inactivar condicionalmente MELK en dos líneas de células de cáncer de mama basales (MDA-MB-468, BT-549) suprime la expresión de MELK e inhibe la proliferación celular. Los paneles izquierdos de inmunotransferencia indican expresión de MELK en células sin tratar o tratadas con doxiciclina (Dox, 100 ng/ml) durante tres días. Los paneles central y derecho muestran respectivamente la tinción con cristal violeta de las placas y la cuantificación de la tinción. Las barras de error indican desviación estándar. **** indica el valor de $p < 0,001$. (D) Inactivar condicionalmente MELK en dos líneas de células de cáncer de mama luminales (MCF-7, T47D) inhibe la expresión de MELK, pero ejerce poco efecto sobre la proliferación celular. Los paneles están dispuestos como en (C). * $p < 0,001$. (E) La expresión de MELK resistente a shMELK rescata los fenotipos inducidos por el silenciamiento de MELK. Se introdujeron establemente célula MDA-MB-468 con tet-on-shMELK estable con un vector de expresión de gen inducible por tetraciclina que codifica GFP, o MELK resistente a shMELK no mutante, o MELK resistente a shMELK inactivo para cinasas. Obsérvese que MELK exógena está marcada con Flag, causando un ligero desplazamiento de MELK sobre el gel de proteína. Los paneles izquierdo, central y derecho muestran respectivamente inmunotransferencia, tinción con cristal violeta y análisis cuantitativo de la proliferación celular.

La Figura 7 demuestra que MELK es necesario para la proliferación de células de cáncer de mama de tipo basal.

(A) Líneas de células de cáncer de mama triple negativo tienen nivel de MELK más alto que células de cáncer de mama ER/PR+. Se obtuvieron los datos de ARNm de MELK entre las 21 líneas de células de cáncer de mama triple negativo establecido y 14 ER/PR+ del conjunto de datos de Neve (Neve et al., 2006). La línea negra de cada grupo representa media \pm EEM. Se calculó el valor de p por la prueba de la t de Student. (B) Inactivar condicionalmente MELK en dos líneas celulares BBC adicionales suprime la proliferación celular. Los paneles izquierdos de inmunotransferencia indican la expresión de MELK en células expuestas a doxiciclina (100 ng/ml) durante tres días. Los paneles derechos representan la cuantificación de proliferación celular, con barras de error que indican desviación estándar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (C) Generación de ADNc de MELK resistente a shMELK (MELK-R). Arriba, la secuencia 21-mera marcada por shMELK2 está marcada en negrita.

Las mutaciones silenciosas se indican por las flechas. Abajo, el ARNhp indicado (combinado o shMELK) se co-transfectó con plásmido que codifica GFP, o MELK parental, o MELK-R. Se recogieron lisados celulares para inmunotransferencia. Obsérvese que MELK-R, pero no MELK no mutante parental, es resistente a shMELK.

La Figura 8 ilustra que MELK es necesario para el crecimiento maligno de células de cáncer de mama de tipo basal.

(A) La inactivación de MELK suprime el crecimiento celular dependiente de anclaje. Se sembraron las células indicadas en 0,3 % de agar, y se trataron sin o con 100 ng/ml de doxiciclina. Los paneles izquierdo y central muestran respectivamente la tinción de cristal violeta de las colonias e imágenes de campo brillante de las colonias. El panel derecho indica el número de colonias por pocillo de una placa de 12 pocillos. Las barras de error representan la desviación estándar. * $p < 0,001$. (B, C) Inactivar condicionalmente MELK altera el crecimiento tumoral. Se implantaron ortotópicamente células MDA-MB-468 (B) o MDA-MB-231 (C) con tet-on-shMELK estables en los panículos adiposos mamarios de ratones sin pelo. La mitad de los ratones se administraron con agua para beber complementada con doxiciclina a partir del segunda día de inyección. El histograma indica volumen o peso del tumor medido siete semanas después del tratamiento. Las barras de error representan error estándar. (D-G) Inactivar MELK en tumores establecidos altera el crecimiento tumoral y provoca la regresión en tumores basales (MDA-MB-468, MDA-MB-231) pero no luminales (T47D, MCF-7). Las células indicadas se implantaron en los panículos adiposos mamarios de ratones. Cuando los tumores crecieron en el tamaño promedio de 200 mm³, los ratones se dividieron al azar en dos grupos, recibiendo un grupo doxiciclina. Se midieron los tamaños de los tumores en los días indicados después de los tratamientos. * indica $p < 0,001$. Las barras de error representan el error estándar.

La Figura 9 ilustra que MELK es necesario para el crecimiento maligno de células de cáncer de mama de tipo basal.

No se trataron ratones con tumores mamarios derivados de las células indicadas con tet-shMELK estable o se trataron con agua complementada con doxiciclina durante cuatro días. Se usaron lisados de tumores para inmunotransferencia, la α - o β -tubulina sirvió de control de carga.

La Figura 10 ilustra que la inhibición de MELK produce muerte celular y mitosis alterada.

(A) El ensayo de inmunotransferencia revela marcadores de apoptosis inducidos por la inhibición de MELK. Las células indicadas se dejaron sin tratar o se trataron con 100 ng/ml de doxiciclina durante cuatro días. Se prepararon lisados celulares y se sometieron a inmunotransferencia usando los anticuerpos indicados. (B) La inhibición de MELK induce la fragmentación de ADN. Se trataron células MDA-MB-468 con el ARNhp estable indicado como en (A), seguido de fijación y tinción con DAPI. Obsérvese que la tinción brillante y de tipo partícula indica la fragmentación de ADN. (C) La inhibición de MELK produce muerte celular dependiente de caspasas. Células MDA-MB-468 con shMELK estuvieron o bien sin tratar o bien se trataron con 100 ng/ml de doxiciclina durante 4 días, con los últimos dos días con zVad-fmk 40 μ M o vehículo. Se prepararon lisados para inmunotransferencia, con β -tubulina como control de carga. (D) La inhibición de MELK induce muerte celular selectivamente en células de cáncer de mama basal. Las células indicadas se dejaron sin tratar o se trataron con doxiciclina durante cuatro días antes de que los lisados celulares se prepararan para inmunotransferencia. Obsérvese que el silenciamiento de MELK induce la aparición de marcador apoptótico (PARP escindida) en células BT549 pero no en MCF7. (E) La inhibición de MELK induce la acumulación de células con ADN de 4n. No se trataron células MDA-MB-468 con shMELK o se trataron con doxiciclina durante cinco días. Se prepararon muestras para el análisis del ciclo celular y para inmunotransferencia. El panel izquierdo muestra distribución del ciclo celular representativa; el histograma central indica la cuantificación del % de células con contenido de ADN de 4n; y el panel derecho muestra inmunotransferencia. Obsérvese que la inactivación de MELK induce la acumulación de células con contenido de ADN de 4n, además de la expresión de marcadores mitóticos. (F) Se inducen citocinas defectuosas por la inhibición de MELK. Las células se dejaron sin tratar o se trataron con doxiciclina durante cuatro días, seguido de fijación y tinción con DAPI. Se adquirieron imágenes con una lente de objetivo 20x. Cada círculo representa un campo único seleccionado al azar (número total de células contadas > 500 para cada grupo). Los datos indican el porcentaje de células con dos o más de dos núcleos. Las líneas negras indican la mediana \pm EEM. (G) La inhibición de MELK induce defectos pleiotrópicos en la mitosis. Se obtuvieron imágenes fluorescentes de células teñidas con anti- β -tubulina (verde) y DAPI (ADN). (H) Análisis de microscopio de lapso de tiempo. Células MDA-MB-468 con shMELK estable e histona 2B-GFP se dejaron sin tratar o se trataron con doxiciclina durante tres días, y luego se sometieron a obtención de imágenes de lapso de tiempo. El tiempo se da en horas : minutos. El panel superior muestra células mitóticas de control; el central indica una célula con dos núcleos que experimentan muerte celular; en los marcos inferiores, una célula deja de avanzar a la anafase, terminando en muerte celular.

La Figura 11 ilustra que la inhibición de MELK produce muerte celular y mitosis alterada.

(A) Imágenes de campo brillante de células indicadas sin tratar o tratadas con doxiciclina para la inducción de silenciamiento de MELK. (B) Tinción de DAPI e imágenes de campo brillante de células MDA-MB-468 con tet-shMELK. Las células estuvieron sin tratar o se trataron con doxiciclina durante 4 días, y adicionalmente se trataron con zVad-fmk o vehículo durante los últimos dos días. (C) Inactivar condicionalmente MELK en células BT549 induce la acumulación de células con contenido de ADN de 4n y la parada de G2/M. Células BT549 con tet-shMELK fueron o bien tratadas sin o con doxiciclina durante cinco días. Las células se sometieron a análisis de ciclo celular por FACS e inmunotransferencia. Los paneles izquierdo, central y derecho muestran respectivamente inmunotransferencia, histogramas de distribución del ciclo celular representativos, y la cuantificación del % de células con contenido de ADN de 4n. Las líneas negras indican la mediana \pm DE. (D) La

tinción de DAPI revela células con múltiples núcleos. Células MDA-MB-468 con tet-shMELK estuvieron sin tratar o se trataron con doxiciclina (100 ng/ml). Las flechas indican células con dos o más núcleos.

La Figura 12 ilustra que FoxM1 se expresa en exceso en cáncer de mama de tipo basal y regula la expresión de MELK.

5 (A) Expresión de MELK dependiente del ciclo celular. Se dejaron sin tratar células MDA-MB-231 (asíncronas, As) o se trataron con 100 ng/ml de nocodazol durante 18 h. Se recogieron células mitóticas (M) por sacudidas, con las células unidas enriquecidas en la fase G2 (G2). Un subconjunto de las células mitóticas se lavó para eliminar el nocodazol, y las células unidas (M + 4 h) se recogieron después de 4 horas de incubación. Los paneles izquierdo y derecho muestran el análisis de FACS del ciclo celular e inmunotransferencia. (B) Alta expresión de FoxM1 en cáncer de mama de tipo basal. Muestras en los conjuntos de datos indicados se agruparon en subtipos basados en el distintivo del gen PAM50 (Parker et al., 2009). *** $p < 0,0001$. * $p < 0,05$. (C) La expresión de FoxM1 y MELK están estrechamente correlacionadas. Se representó la expresión de MELK contra la de FoxM1. Cada círculo representa una muestra de tumor de mama humano individual (n=349 para el conjunto de datos de TCGA; n=338 para el conjunto de datos de Bittner), indicando el rojo y verde respectivamente cáncer de mama de tipo basal y otros subtipos. Se realizó análisis de correlación por GraphPad Prism. (D) Inactivar FoxM1 suprime la expresión de MELK. Las células se transfectaron con o bien ARNip de control o ARNip que se dirige a FoxM1. Se recogieron lisados tres días después de la transfección, y se sometieron a inmunotransferencia. Se usó cinasa aurora A (AURKA), una diana transcripcional conocida de FoxM1 (Lefebvre et al., 2010), como control positivo. (E) La inhibición de FoxM1 regula por disminución la expresión de MELK. Se trataron células MDA-MB-231 durante el tiempo indicado con vehículo (0,1 % de DMSO) o tiostreptona 10 μ M, un inhibidor de FoxM1 (Hegde et al., 2011). Se prepararon lisados de proteína para inmunotransferencia. (F) Arriba: sitio de unión a FoxM1 putativo en el promotor de MELK. Las secuencias de nucleótidos mostradas son el sitio de unión a FoxM1 putativo en el promotor de MELK (arriba) y el sitio de unión consenso de FoxM1 (abajo). Los números para los nucleótidos son con respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1) de MELK. Abajo: Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina del promotor de MELK en células MDA-MB-468. Se usaron IgG de conejo de control y anticuerpo contra FoxM1. Se usaron cebadores para la región promotora de CDC25B como control positivo.

La Figura 13 ilustra que FoxM1 se expresa en exceso en cáncer de mama de tipo basal y regula la expresión de MELK.

30 (A) Expresión dependiente del ciclo celular de MELK. Se dejaron sin tratar células MDA-MB-468 (asíncronas, As) o se trataron con 100 ng/ml de nocodazol durante 18 h. Se recogieron células mitóticas (M) por sacudidas, con las células unidas recogidas como aquellas enriquecidas en la fase G2 (G2). Se lavó una parte de las células mitóticas con nocodazol, y se incubaron durante cuatro horas antes de que se recogieran las células unidas (M + 4 h). Se prepararon los lisados de las células preparadas y se sometieron a inmunotransferencia usando los anticuerpos indicados. (B) Expresión de FoxM1 en subtipos de cáncer de mama que se definen por la pauta de expresión génica. Muestras en las dos cohortes indicadas se agruparon en subtipos basados en el distintivo del gen PAM50 (Parker et al., 2009). "****" indica valor de $p < 0,0001$. (C) La expresión de FoxM1 es significativamente más alta en cáncer de mama triple negativo que en otros subtipos. Las muestras se clasificaron en subtipos basándose en la expresión de proteínas de receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), o factor 2 de crecimiento epidérmico humano (HER2). Los valores de p indicados fueron de comparar la expresión de MELK en cáncer de mama triple negativo con aquellos en ER/PR+. (D) La expresión de FoxM1 y MELK están estrechamente correlacionadas. Se representó la expresión de MELK contra la de FoxM1. Cada círculo representa una muestra de tumor de mama humano individual (n=295 para el conjunto de datos de van de Vijver; n=508 para el conjunto de datos de Hatzis). Se realizó el análisis de correlación por GraphPad Prism. (E) La inhibición de FoxM1 por tiostreptona disminuye la transcripción de MELK. Se trataron células con vehículo o tiostreptona durante 16 h, y se extrajo ARN total seguido de síntesis de ADNc. Se realizó PCR cuantitativa usando los cebadores para los genes indicados. Las barras de error indican desviación estándar. "" indica valor de $p < 0,01$.

La Figura 14 ilustra que MELK se expresa altamente en subtipo de cáncer de mama basal.

50 La Figura 15 muestra altos niveles de expresión de MELK en células de cáncer de mama ER negativo. (A) Expresión del gen MELK en líneas celulares modelo. (B) PCR cuantitativa que muestra elevada expresión de MELK en líneas celulares ER-.

La Figura 16 muestra que las células de cáncer de mama BT549 (ER-, MELK alta) dependen de MELK.

La Figura 17 muestra que las células de cáncer de mama MDA-MB-468 (ER-, MELK alta) dependen de MELK.

55 La Figura 18 muestra que las células de cáncer de mama MDA-MB-231 (ER-, MELK alta) dependen de MELK.

La Figura 19 muestra que las células de cáncer de mama MCF7 (ER+, MELK baja) no dependen de MELK.

La Figura 20 muestra células epiteliales mamarias normales (HMEC) y las células MCF10A inmortalizadas no dependen de MELK.

60 La Figura 21 ilustra que el rescate parcial sugiere actividad de cinasa que puede ser requerida para la proliferación de líneas de CMTN dependientes de MELK.

Descripción detallada

65 La presente invención se refiere al descubrimiento de que se ha identificado cinasa embrionaria materna de la cremallera de leucina (MELK) como una cinasa oncogénica que es esencial en células de cáncer de mama ER negativo, en de tipo basal (ER/PR negativo) y en triple negativo, pero no en células de cáncer de mama luminal,

para potencial tumorigénico sostenido. Además, se ha identificado que MELK es crítico para la progresión mitótica de células, y está directamente regulado por el factor de transcripción FoxM1. La presente invención también se refiere a métodos de inhibición del crecimiento o la proliferación de células de cáncer de mama y a métodos para tratar sujetos que tienen cáncer de mama. La presente invención se refiere además a métodos de identificación de sujetos que tienen cáncer de mama que es probable que se beneficien del tratamiento con un inhibidor de MELK o un inhibidor de Fox M1.

MELK

La cinasa embrionaria materna de la cremallera de leucina (MELK) es un miembro atípico de la familia de serina/treonina cinasas de la cinasa de proteína activada por AMP (AMPK). MELK participa en la renovación de células madre, progresión del ciclo celular y corte y empalme de pre-ARNm (Gen ID 9833.)

FoxM1

La familia de la caja Forkhead (Fox) de mamífero de factores de transcripción incluye más de 50 proteínas de mamífero que comparten homología en el dominio de unión a ADN de hélice alado. La expresión del factor de transcripción de FoxM1 se induce durante la fase G1 del ciclo celular, y su expresión continúa durante la fase S y mitosis). FoxM1 se expresa en todas las células de mamífero proliferantes y líneas celulares derivadas de tumor, y su expresión se extingue en células terminalmente diferenciadas que salen del ciclo celular. La actividad transcripcional de la proteína FoxM1 depende de la señalización de Ras-MAPK (Wang et al. 2005). FoxM1 regula la expresión de muchos genes específicos de G2 y es esencial para la estabilidad de cromosomas. La pérdida de FoxM1 conduce a defectos del ciclo celular pleiotrópicos, que incluyen un retraso en G2, segregación errónea de cromosomas y frecuente fracaso de la citocinesis. La activación transcripcional de ciclina B por FoxM1 es esencial para la entrada mitótica cronometrada (Laoukili et al. 2005).

Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea con un alto grado de diversidad en histología, respuesta terapéutica y desenlaces del paciente. Los análisis de perfilado transcripcional han identificado reproduciblemente al menos cinco subtipos "intrínsecos" principales de cáncer de mama: cáncer de mama de tipo mama normal, luminal A, luminal B, enriquecido en HER2/Neu y de tipo basal (BBC) (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001). A diferencia de sus homólogos luminales, las células de BBC carecen de expresión del receptor de estrógeno (ER) y receptor de progesterona (PR), y así se solapan en gran medida con los cánceres de mama "triple negativo" clínicamente definidos (CMTN), que también se caracterizan por la ausencia de expresión de ER/PR (Foulkes et al. 2010; Perou 2011). La ausencia de estas dianas moleculares convierte las células de BBC o CMTN en relativamente insensibles a las terapias dirigidas que son altamente eficaces en el tratamiento de cáncer de mama luminal. Un aspecto descrito en el presente documento identifica sujetos con cáncer de mama que tienen células cancerosas que son receptor de estrógeno negativo (ER⁻). Otro aspecto descrito en el presente documento identifica sujetos con cáncer de mama que tienen células cancerosas que son receptor de progesterona negativo (PR⁻). Otro aspecto más descrito en el presente documento identifica sujetos con cáncer de mama que tienen células cancerosas que son HER2 negativo (HER2⁻). Se identifican sujetos que son ER⁻ y PR⁻. En algunas realizaciones, se identifica que los sujetos son ER⁻, PR⁻ y HER2⁻.

Pueden usarse métodos inmunohistoquímicos o de inmunotransferencia para determinar el estado de ER, PR y HER2 de los sujetos. También pueden usarse otros métodos. Un anticuerpo ER a modo de ejemplo que puede usarse es el anticuerpo 1D5, un anticuerpo PR a modo de ejemplo que puede usarse es el clon Pgr636 y una prueba de HER2 a modo de ejemplo que puede usarse es HercepTest™ (DAKO North America, Carpinteria, CA).

Inhibidores

Como se usa en el presente documento, el término "inhibir", "que inhibe" o "inhiben el crecimiento o la proliferación" de la célula de cáncer de mama se refiere a ralentizar, interrumpir, detener o parar el crecimiento de la célula de cáncer de mama, y necesariamente no indica una eliminación total del crecimiento de células de cáncer de mama. Los términos "inhibir" y "que inhibe", o similares, indican diferencias cuantitativas entre dos estados, se refieren a al menos diferencias estadísticamente significativas entre los dos estados. Por ejemplo, "una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama" significa que la tasa de crecimiento de las células será al menos estadísticamente significativamente diferente de las células sin tratar. Tales términos se aplican en el presente documento a, por ejemplo, tasas de proliferación celular.

El término "inhibidor de MELK" o "inhibidor de FoxM1" se refiere a cualquier compuesto capaz de inhibir una expresión o actividad de MELK o FoxM1, respectivamente, es decir, en particular, cualquier compuesto que inhibe la transcripción del gen, la maduración de ARN, la traducción de ARNm, la modificación postraduccional de la proteína, la actividad enzimática de la proteína, la interacción de la misma con un sustrato, etc.

Ejemplos no limitantes de inhibidores incluyen iARN, ribozimas, moléculas antisentido, aptámeros, anticuerpos, o cualquier tipo de agonista. En algunas realizaciones, puede usarse interferencia por ARN para inhibir la expresión o actividad de MELK o FoxM1, o ambos, MELK y FoxM1. Moléculas capaces de mediar en la interferencia por ARN incluyen, pero no se limitan a, ARN interferente pequeño (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc), micro-ARN (miARN) y ARN de horquilla pequeña (ARNhp). Como se usa en el presente documento, moléculas capaces de mediar en iARN no necesitan limitarse a aquellas moléculas que contienen solo ARN, sino que engloban además nucleótidos químicamente modificados y no nucleótidos, denominados moléculas "ANip", "ácido nucleico interferente pequeño". Tales moléculas de ANip que no requieren la presencia de ribonucleótidos dentro de la molécula de ANip para soportar el iARN pueden, sin embargo, tener un conector o conectores unidos u otros grupos, restos o cadenas unidos o asociados que contienen uno o más nucleótidos con grupos 2'-OH. Opcionalmente, las moléculas de ANip pueden incluir ribonucleótidos en aproximadamente el 5, 10, 20, 30, 40, o el 50 % de las posiciones de nucleótido.

El término "interferencia por ARN (iARN)" se refiere al proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia iniciado por moléculas capaces de mediar en la iARN descrita anteriormente (Fire et al., 1998, *Nature*, 391, 806-11). El ARN bicatenario (ARNbc) largo en las células estimula la actividad de una enzima ribonucleasa III denominada Dicer. Dicer participa en el procesamiento del ARNbc largo en trozos cortos de ARNip (Bernstein et al., 2001, *Nature*, 409, 363-6). Los ARNip derivados de la actividad de Dicer normalmente tienen aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud e incluyen dúplex de aproximadamente 19 pares de bases.

La respuesta de iARN también caracteriza un complejo de endonucleasa que contiene un ARNip, comúnmente denominado un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que media en la escisión de ARN monocatenario que tiene secuencia complementaria a la hebra no codificante del dúplex de ARNip. La escisión del ARN diana tiene lugar en el centro de la región complementaria a la hebra no codificante del dúplex de ARNip (Elbashir et al., 2001, *Nature*, 411, 494-498). Se ha estudiado la iARN mediada por ARNip en una variedad de sistemas. Trabajo reciente en lisados embrionarios de *Drosophila* ha revelado ciertos requisitos para la longitud de ARNip, estructura, composición química y secuencia que son esenciales para mediar en la eficiente actividad de iARN (Elbashir et al., 2001, *EMBO J.*, 20, 6877-88). Durante la iARN, se induce la degradación de ARNm diana con la consecuente inhibición específica de secuencia de la expresión génica. El término "interferente pequeño" o "ARN interferente pequeño" o "ARNip" se refiere a un ácido nucleico que forma un ARN bicatenario, ARN bicatenario que tiene la capacidad de reducir o inhibir la expresión de un gen o gen diana cuando el ARNip se expresa en la misma célula que el gen o gen diana. "ARNip" se refiere así al ARN bicatenario formado por las hebras complementarias. Las porciones complementarias del ARNip que se hibridan para formar la molécula bicatenaria normalmente tienen identidad sustancial o completa. En una realización, un ARNip se refiere a un ácido nucleico que tienen identidad sustancial o completa con un gen diana y forma un ARNip bicatenario. La secuencia del ARNip puede corresponderse con el gen diana de longitud completa, o una subsecuencia del mismo. El ARNip es "dirigido" a un gen en el que la secuencia de nucleótidos de la porción de dúplex del ARNip es sustancialmente complementaria a una secuencia de nucleótidos del gen dirigido. El dúplex de la secuencia de ARNip necesita ser de longitud suficiente para poner el ARNip y ARN diana juntos mediante interacciones de apareamiento de bases complementarias. El ARNip puede ser de longitudes variables. La longitud del ARNip es preferentemente superior o igual a diez nucleótidos y de longitud suficiente para interactuar establemente con el ARN diana; específicamente 10-30 nucleótidos; más específicamente cualquier número entero entre 10 y 30 nucleótidos, tales como 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30. Por "longitud suficiente" se indica un nucleótido superior o igual a 10 nucleótidos que es de una longitud lo suficientemente grande para proporcionar la función prevista en la condición esperada. El término "interaccionar establemente" se refiere a la interacción del ARN interferente pequeño con ácido nucleico diana (por ejemplo, formando enlaces de hidrógeno con nucleótidos complementarios en la diana en condiciones fisiológicas).

El ARNip puede ser codificado por una secuencia de ácidos nucleicos, y la secuencia de ácidos nucleicos también puede incluir un promotor. La secuencia de ácidos nucleicos también puede incluir una señal de poliadenilación. La señal de poliadenilación puede ser una señal de poliadenilación mínima sintética. El dúplex de ARN del ARNip puede construirse *in vitro* usando oligonucleótidos sintéticos.

En algunas realizaciones, el inhibidor puede ser una secuencia de ARN de horquilla pequeña (ARNhp). El término "ARN de horquilla pequeña" o "ARNhp" se refiere a moléculas de ARN que tienen una secuencia de ARN que hace un giro de horquilla apretado que puede usarse para silenciar la expresión génica mediante interferencia por ARN. La estructura de horquilla de ARNhp se escinde por la maquinaria celular en ARNip, que entonces se une al complejo de silenciamiento de ARN (RISC). Este complejo se une a y escinde ARNm que coinciden con el ARNip al que está unido. La secuencia del ARNip puede corresponderse con el gen diana de longitud completa, o una subsecuencia del mismo. El ARNip es "dirigido" a un gen en el que la secuencia de nucleótidos de la porción de dúplex del ARNip es sustancialmente complementaria a una secuencia de nucleótidos del gen dirigido como se ha descrito anteriormente. El ARNhp puede clonarse en un vector usando técnicas de ADN recombinante.

Pueden construirse ARNip *in vitro* usando oligonucleótidos sintéticos o enzimas de transcripción apropiadas o *in vivo* usando enzimas de transcripción o vectores de expresión apropiados. Los ARNip incluyen una hebra de ARN codificante y una hebra de ARN no codificante complementaria hibridadas juntas por interacciones de apareamiento de bases de Watson-Crick estándar para formar los pares de bases. Las hebras codificantes y no codificantes del

presente ARNip pueden ser moléculas de ARN monocatenario complementarias para formar un ARNip bicatenario (bc) o un polinucleótido de ADN que codifica dos porciones complementarias que pueden incluir una estructura de horquilla que enlaza los pares de bases complementarios para formar el ARNip. Preferentemente, las regiones de dúplex del ARNip formado por el ARNbc o por el polipéptido de ADN incluyen aproximadamente 15-30 pares de bases, más preferentemente, aproximadamente 19-25 pares de bases. La longitud de la región de dúplex del ARNip puede ser cualquier número entero positivo entre 15 y 30 nucleótidos.

El ARNip derivado de ARNbc puede incluir ARN parcialmente purificado, ARN sustancialmente puro, ARN sintético, o ARN recombinantemente producido, además de ARN alterado que se diferencia del ARN que existe de forma natural mediante la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir la adición de material no de nucleótido, tal como al (a los) extremo(s) del ARNip o a uno o más nucleótidos internos del ARNip, que incluyen modificaciones que hacen que el ARNip sea resistente a la digestión por nucleasas.

Una o ambas hebras del ARNip puede incluir un nucleótido protuberante de 3'. Como se usa en el presente documento, un "nucleótido protuberante de 3'" se refiere a al menos un nucleótido no emparejado que se extiende desde el extremo 3' de una hebra de ARN. Así, en una realización, el ARNip puede incluir al menos un nucleótido protuberante de 3' de 1 a aproximadamente 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxinucleótidos) de longitud, preferentemente de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, más preferentemente de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud, y particularmente preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud.

Ambas hebras de la molécula de ARNip pueden incluir un nucleótido protuberante de 3', cuya longitud de los nucleótidos protuberantes puede ser igual o diferente para cada hebra. Preferentemente, el nucleótido protuberante de 3' puede estar presente en ambas hebras del ARNip, y tiene 2 nucleótidos de longitud. Los nucleótidos protuberantes de 3' también pueden estabilizarse contra la degradación. Por ejemplo, los nucleótidos protuberantes pueden estabilizarse incluyendo nucleótidos de purina, tales como nucleótidos de adenosina o guanosina, por sustitución de nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, por ejemplo, la sustitución de nucleótidos de uridina en los nucleótidos protuberantes de 3' con 2'-desoxitimidina está tolerada y no afecta la eficiencia de la degradación de iARN. En particular, la ausencia de un 2'-hidroxilo en la 2'-desoxitimidina potencia significativamente la resistencia a nucleasa del nucleótido protuberante de 3' en medio de cultivo de tejido.

Como se ha descrito anteriormente, la porción de dúplex de ARN del ARNip puede ser parte de una estructura de horquilla. La estructura de horquilla puede contener además una porción de bucle posicionada entre las dos secuencias que forman el dúplex. El bucle puede variar en longitud. En algunas realizaciones, el bucle puede tener 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 nucleótidos en longitud. La estructura de horquilla también puede contener 3' o 5' porciones de nucleótidos protuberantes. En algunas realizaciones, el nucleótido protuberante es un nucleótido protuberante de 3' o de 5' de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de longitud.

El ARNip para su uso en la invención puede obtenerse usando varias técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, el ARNip puede ser químicamente sintetizado usando fosforamiditos de ribonucleósido apropiadamente protegidos y un sintetizador de ADN/ARN convencional. El ARNip puede sintetizarse como dos moléculas de ARN complementarias separadas, o como una única molécula de ARN con dos regiones complementarias. Proveedores comerciales de moléculas de ARN sintético o reactivos de síntesis incluyen Dharmacon Research (Lafayette, Colo., EE.UU.), Pierce Chemical (Rockford, Ill., EE.UU.), Glen Research (Sterling, Va., EE.UU.), ChemGenes (Ashland, Masa., EE.UU.) y Cruachem (Glasgow, RU).

Sistemas de administración

En algunas realizaciones, el inhibidor de MELK y/o el inhibidor de FoxM1 pueden administrarse a la célula usando un sistema de administración de ácidos nucleicos, tal como un vector. El término "vector" se refiere a cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que es capaz de replicación cuando se asocia a los elementos de control apropiados, tales como un virus auxiliar, y que puede transferir secuencias de genes entre células. Así, el término incluye vehículos de clonación y expresión, además de vectores virales defectuosos en la replicación. Existen numerosos tipos de vectores y son muy conocidos en la técnica.

El término "recombinante", cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de un ácido nucleico nativo o proteína, o que la célula deriva de una célula así modificada. Así, por ejemplo, células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que son de otro modo anormalmente expresados, expresados por defecto, o no se expresan en absoluto.

El término "heterólogo", cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por

ejemplo, el ácido nucleico normalmente se produce recombinantemente, teniendo dos o más secuencias de genes sin relacionar dispuestos para producir un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor de una fuente y una región codificante de otra fuente. Similarmente, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

El término "operativamente unido" significa que una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada, por ejemplo, que codifica una construcción de ARNip está en proximidad con un promotor para permitir que el promotor regule la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos seleccionada. En general, el promotor se localiza en la dirección 5' de la secuencia de ácidos nucleicos seleccionada en términos de la dirección de transcripción y traducción.

El término "variante" de una molécula es una secuencia que es sustancialmente similar a la secuencia de la molécula nativa. Para secuencias de nucleótidos, variantes incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos idéntica de la proteína nativa. Variantes alélicas que existen de forma natural, tales como éstas, pueden identificarse con el uso de técnicas de biología molecular, como, por ejemplo, con las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación. Las secuencias de nucleótidos de variante también incluyen secuencias de nucleótidos sintéticamente derivadas, tales como aquellas generadas, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida al sitio, que codifica la proteína nativa, además de aquellas que codifican un polipéptido que tiene sustituciones de aminoácidos. Generalmente, las variantes de secuencia de nucleótidos tendrán al menos aproximadamente del 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, al 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos nativa (endógena).

El término "variaciones conservativamente modificadas" de una secuencia de ácidos nucleicos particular se refiere a aquellas secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, los codones CGT, CGC, CGA, CGG, AGA y AGG codifican todos el aminoácido arginina. Así, en cada posición donde una arginina está especificada por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar la proteína codificada. Tales variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de "variaciones conservativamente modificadas". Cada secuencia de ácidos nucleicos descrita en el presente documento que codifica un polipéptido también describe cada variación silenciosa posible, excepto donde se indique de otro modo. Un experto en la materia reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto ATG, que es generalmente el único codón para metionina) puede modificarse para dar una molécula funcionalmente idéntica por técnicas convencionales. Por consiguiente, cada "variación silenciosa" de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Los términos "sustancialmente idénticos" o "identidad sustancial", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, al menos aproximadamente el 60 %, preferentemente el 65 %, 70 %, 75 %, preferentemente el 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad con respecto a una región especificada), cuando se comparan y se alinean para la máxima correspondencia con respecto a una ventana de comparación, o región designada como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineamiento manual e inspección visual. Esta definición, cuando lo indique el texto, también se refiere análogamente al complemento de una secuencia, tal como un nucleótido de ARN complementario a un nucleótido de ADN. Preferentemente, la identidad sustancial existe durante una región que tiene al menos aproximadamente 6-7 aminoácidos o 25 nucleótidos de longitud.

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., 1977, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402. BLAST se usa, con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos y proteínas descritos en el presente documento. El software para realizar los análisis de BLAST está públicamente disponible mediante el Centro Nacional para Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda, que tanto coinciden como satisfacen alguna puntuación de valor umbral positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabras en la vecindad (Altschul et al., arriba). Estas palabras comunes en la vecindad iniciales actúan de semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que las contengan. Entonces, las palabras comunes se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia para que, en la medida de lo posible, pueda puntuarse el alineamiento acumulativo. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las palabras comunes en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada se sale por la cantidad X de su máximo valor alcanzado; la puntuación acumulada tiende a cero o por debajo debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativos; o se

alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) o 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como valores por defecto una longitud de palabra de 3, y esperanza (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915 (1989)) alineamientos (B) de 50, esperanza (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 90:5873-5787 (1993)). Una medición de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,2, más preferentemente inferior a aproximadamente 0,01, y lo más preferentemente inferior a aproximadamente 0,001.

El ADN recombinante puede ser fácilmente introducido en las células hospedadoras, por ejemplo, células de mamífero, bacterianas, de levadura o insecto por transfección con un vector de expresión compuesto de ADN que codifica el ARNip por cualquier procedimiento útil para la introducción de una célula particular, por ejemplo, métodos físicos o biológicos, dando una célula que tiene el ADN recombinante establemente integrado en su genoma o que existe como un elemento episómico, de manera que las moléculas de ADN, o secuencias, sean expresadas por la célula hospedadora. Preferentemente, el ADN se introduce en células hospedadoras mediante un vector. La célula hospedadora es preferentemente de origen eucariota, por ejemplo, fuentes de planta, mamífero, insecto, levadura o fúngico, pero también pueden emplearse células hospedadoras de origen no eucariota.

Métodos físicos de introducción de un dúplex de ADN o ARN preseleccionado en una célula hospedadora incluyen, pero no se limitan a, precipitación con fosfato de calcio, lipofección, DEAE-dextrano, bombardeo con partículas, microinyección, electroporación, inmunoliposomas, lípidos, lípidos catiónicos, fosfolípidos, o liposomas y similares. Un experto en la materia entenderá que puede usarse cualquier método para administrar el dúplex de ADN o ARN en la célula.

Vectores de ARNip

El ARNip para su uso en la presente invención también puede expresarse a partir de un plásmido recombinante ya sea como dos moléculas de ARN complementarias separadas, o como una única molécula de ARN con dos regiones complementarias.

La selección de vectores adecuados para expresar métodos de ARNip para insertar secuencias de ácidos nucleicos para expresar el ARNip en el plásmido, y métodos de administración del plásmido recombinante a las células de interés, están dentro de la experiencia en la materia. Métodos de construcción de vectores de ADN recombinante y producción de ADN puede encontrarse en Sambrook et al., por ejemplo.

El ARNip para su uso en la presente invención puede ser una secuencia de polinucleótidos clonada en un vector plasmídico y expresada usando cualquier promotor adecuado. Promotores adecuados para expresar ARNip de un plásmido incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de promotores pol III de ARN H1 y U6 y promotores virales que incluyen los promotores de LTR viral, adenovirus, SV40 y del CMV. También pueden usarse promotores adicionales conocidos para un experto en la materia, que incluyen promotores específicos de tejido, inducibles o regulables para la expresión del ARNip en un tejido particular o en un entorno intracelular particular. El vector también puede incluir elementos reguladores o estructurales adicionales, que incluyen, pero no se limitan a intrones, potenciadores y secuencias de poliadenilación. Estos elementos pueden incluirse en el ADN según se desee para obtener rendimiento óptimo del ARNip en la célula y pueden o pueden no ser necesarios para la función del ADN. Opcionalmente, pueden incluirse un gen marcador de selección o un gen indicador, ya sea con el ARNip que codifica el polinucleótido o como un plásmido separado para la administración a las células diana. También pueden incluirse elementos adicionales conocidos para un experto en la materia.

El ARNip también puede expresarse de una secuencia de polinucleótidos clonada en un vector viral que puede incluir los elementos descritos anteriormente. Vectores virales adecuados para administración génica a una célula incluyen, pero no se limitan a, virus deficientes en la replicación que son capaces de dirigir la síntesis de todas las proteínas de virión, pero son incapaces de producir partículas de infección. Virus a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus y alfavirus.

Los presentes inventores describen métodos que emplean, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, inmunología, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro de la experiencia de la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (edición actual); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel et al. eds., (edición actual)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL

APPROACH (edición actual) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (edición actual)). DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., actual edición); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., edición actual); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., edición actual); Fundamental Virology, 2ª edición, vol. I & II (B. N. Fields and D. M. Knipe, eds.)

Marcadores de diagnóstico/pronóstico

Los presentes inventores describen en el presente documento métodos de detección de la presencia de uno o más marcadores de diagnóstico o pronóstico en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica de un paciente con cáncer). Puede usarse una variedad de métodos de cribado conocidos para un experto en la materia para detectar la presencia del marcador en la muestra que incluyen la detección de ADN, ARN y proteína. Las técnicas descritas a continuación pueden usarse para determinar la presencia o ausencia o cantidad de MELK y/o FoxM1 en una muestra obtenida de un paciente con respecto a una muestra obtenida de un sujeto sin cáncer. En algunas realizaciones, el paciente puede probarse para el estado de receptor de ER, PR y HER2. La identificación de MELK y/o FoxM1 o niveles de expresión de MELK y/o FoxM1 en un paciente que tiene un estado ER⁺, ER⁺/PR⁺ o ER⁺/PR⁺/HER2⁺ ayuda al médico a determinar el protocolo de tratamiento para el paciente.

El marcador puede ser un aumento en el número de copias del gen, un aumento en la expresión de proteínas, un cambio en la expresión de ARNm y similares, para MELK y/o FoxM1 con respecto a un control.

A modo de ejemplo, en un paciente que tiene un estado de ER, ER⁺/PR⁺ o ER⁺/PR⁺/HER2⁺, puede indicar la necesidad de tratar el paciente con un inhibidor de MELK o tanto un inhibidor de MELK como un inhibidor de FoxM1. Pacientes que tienen elevada expresión de MELK, Fox M1 o tanto MELK como FoxM1, pueden indicar la necesidad de tratar el paciente con un inhibidor de MELK, un inhibidor de FoxM1, o tanto un inhibidor de MELK como un inhibidor de FoxM1.

Métodos de tratamiento

Los presentes inventores describen en el presente documento métodos para el tratamiento de un paciente que tiene cáncer. Los métodos generalmente comprenden la administración de un inhibidor. Un inhibidor puede ser un inhibidor de MELK. Un inhibidor puede ser un inhibidor de FoxM1. El método puede incluir la administración de un inhibidor de MELK y un inhibidor de FoxM1.

"Tratar", "tratan" o "tratamiento", dentro del presente contexto, significa un alivio de síntomas asociados a un trastorno o enfermedad, o parada de la progresión o empeoramiento adicionales de aquellos síntomas, o prevención o profilaxis de la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, dentro del presente contexto, el tratamiento satisfactorio puede incluir un alivio de síntomas relacionados con el cáncer de mama o una parada en la progresión de una enfermedad tal como cáncer de mama.

En algunas realizaciones, el inhibidor es un compuesto químico, natural o sintético, en particular una molécula orgánica o inorgánica de origen de planta, bacteriano, viral, animal, eucariota, sintético o semisintético, capaz de inhibir MELK o FoxM1. Un ejemplo de un compuesto químico que inhibe FoxM1 incluye tiostreptona.

Como se usa en el presente documento, el término "sales farmacéuticamente aceptables" incluyen aquellas sales formadas, por ejemplo, como sales de adición de ácido, preferentemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, de compuestos con un átomo de nitrógeno básico, especialmente sales farmacéuticamente aceptables. Ácidos inorgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos de halógeno, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, o ácido fosfórico. Ácidos orgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos carboxílico, fosfónico, sulfónico o sulfámico, por ejemplo ácido acético, ácido propiónico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido malónico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azelaico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, aminoácidos, tales como ácido glutámico o ácido aspártico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido adamantanocarboxílico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido ftálico, ácido fenilacético, ácido mandélico, ácido cinámico, ácido metano- o etano-sulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 1,5-naftaleno-disulfónico, ácido 2- o 3-metilbencenosulfónico, ácido metilsulfúrico, ácido etilsulfúrico, ácido dodecilsulfúrico, ácido N-ciclohexilsulfámico, ácido N-metil-, N-etil- o N-propil-sulfámico, u otros ácidos protónicos orgánicos, tales como ácido ascórbico.

Los compuestos pueden usarse solos o en composiciones junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto formulado junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Como se usa en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa una carga sólida, semi-sólida o líquida inerte no tóxica, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir de vehículos farmacéuticamente aceptables son azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como

carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de alazor; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tales como un propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes de tamponamiento tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico, y soluciones de tampón fosfato, además de otros lubricantes compatibles no tóxicos, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, además de agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, también puede estar presentes conservantes y antioxidantes en la composición, según el criterio del formulador. Otros excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Pub. Co., New Jersey, 1991.

Los compuestos pueden administrarse a seres humanos y otros animales por vía oral, por vía parenteral, por vía sublingual, por aerosolización o espray de inhalación, por vía rectal, por vía intracisternal, por vía intravaginal, por vía intraperitoneal, por vía bucal, o por vía tópica en formulaciones unitarias de dosificación que contienen excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales, según se desee. La administración tópica también puede implicar el uso de administración transdérmica tal como parches transdérmicos o dispositivos de iontoforesis. El término parenteral, como se usa en el presente documento, incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal, o técnicas de infusión.

Los métodos de formulación son muy conocidos en la técnica y se desvelan, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19ª Edición (1995). Composiciones farmacéuticas para su uso como se describen en el presente documento pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas sin pirógenos estériles, cápsulas recubiertas, supositorios, polvos liofilizados, parches transdérmicos u otras formas conocidas en la técnica.

Pueden formularse preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles según la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-propanodiol o 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente se emplean aceites no volátiles estériles como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite no volátil suave que incluye mono- o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables. Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de uso.

Con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, se desea frecuentemente ralentizar la absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede llevarse a cabo usando una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La tasa de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, puede llevarse a cabo absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo de aceite. Se preparan formas de liberación prolongada inyectables formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación de fármaco a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la tasa de liberación de fármaco. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). También pueden prepararse formulaciones inyectables de liberación prolongada atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones, que son compatibles con los tejidos del cuerpo.

Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferentemente supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos desvelados en el presente documento con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por tanto, se funden en el recto o cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

Formas de dosificación sólidas para administración por vía oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente inerte o vehículo farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o a) cargas o sustancias de relleno tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidina, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato sódico, e) agentes retardantes de la disolución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol acetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, y i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos,

laurilsulfato de sodio, y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes de tamponamiento.

5 Composiciones sólidas de un tipo similar también puede emplearse como cargas en cápsulas de gelatina duras y blandas usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, además de polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

10 Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos muy conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Pueden contener opcionalmente opacificantes y también pueden ser de una composición de la que liberan el (los) principio(s) activo(s) solo(s), o preferencialmente, en una cierta parte del tubo digestivo, opcionalmente, de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de incorporación que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

15 Los compuestos activos también pueden estar en forma micro-encapsulada con uno o más excipientes como se observa anteriormente. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación y otros recubrimientos muy conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas de dosificación también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes de formación de comprimidos y otros adyuvantes de formación de comprimidos tales como un estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes de tamponamiento. Pueden contener opcionalmente opacificantes y también puede ser de una composición de la que liberan el (los) principio(s) activo(s) solo(s), o preferencialmente, en una cierta parte del tubo digestivo, opcionalmente, de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de incorporación que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

30 Formas de dosificación líquidas para administración por vía oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la materia tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, EtOAc, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

40 Formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de un compuesto desvelado en el presente documento incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, esprays, inhalantes o parches. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario que pueda requerirse. Formulaciones oftálmicas, gotas óticas, y similares, pueden contener un compuesto descrito en el presente documento.

45 Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo desvelado en el presente documento, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

50 Las composiciones desveladas en el presente documento también pueden formularse para la administración como un aerosol líquido o polvo seco inhalable. Las formulaciones en aerosol líquidas pueden nebulizarse predominantemente en tamaños de partícula que pueden administrarse a los bronquiolos terminales y respiratorios.

55 Las formulaciones aerosolizadas desveladas en el presente documento pueden administrarse usando un dispositivo formador de aerosol, tal como un chorro, placa porosa vibratoria o nebulizador ultrasónico, seleccionado preferentemente para permitir la formación de partículas de aerosol que tienen un diámetro promedio medio másico de predominantemente entre 1 y 5 μm . Además, la formulación tiene preferentemente osmolaridad, fuerza iónica y concentración de cloruro equilibradas, y el volumen aerosolizable más pequeño capaz de administrar la dosis eficaz de los compuestos desvelado en el presente documento al sitio de la infección. Adicionalmente, la formulación aerosolizada no altera preferentemente negativamente la funcionalidad de las vías respiratorias y no produce efectos secundarios no deseables.

65 Dispositivos de aerosolización adecuados para la administración de las formulaciones en aerosol descritas en el presente documento incluyen, por ejemplo, chorro, placa porosa vibratoria, nebulizadores ultrasónicos e inhaladores de polvo seco energizados, que son capaces de nebulizar la formulación descrita en el presente documento en tamaño de partícula de aerosol predominantemente en el intervalo de tamaño de 1-5 μm . Predominantemente en la

presente solicitud significa que al menos el 70 % pero preferentemente más del 90%, de todas las partículas de aerosol generadas están dentro del intervalo de 1-5 μm . Un nebulizador de chorro funciona por la presión del aire para romper una solución líquida en gotitas de aerosol. Los nebulizadores de placa porosa vibratoria funcionan usando un vacío sónico producido por una placa porosa rápidamente vibratoria para extraer una gotita de disolvente a través de una placa porosa. Un nebulizador ultrasónico funciona por un cristal piezoeléctrico que cizalla un líquido en pequeñas gotitas de aerosol. Está disponible una variedad de dispositivos adecuados que incluyen, por ejemplo, nebulizadores de placa porosa vibratoria AERONEB y AERODOSE (AeroGen, Inc., Sunnyvale, California), nebulizadores SIDESTREAM (Medic-Aid Ltd., West Sussex, Inglaterra), nebulizadores de chorro PARI LC y PARI LC STAR (Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Virginia) y AEROSONIC (DeVilbiss Medizinische Produkte (Deutschland) GmbH, Heiden, Alemania) y nebulizadores ultrasónicos ULTRAAIRE (Omron Healthcare, Inc., Vernon Hills, Illinois).

Los compuestos descritos en el presente documento también pueden formularse para su uso como polvos tópicos y esprays que pueden contener, además de los compuestos descritos en el presente documento, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los esprays pueden contener además propulsores tradicionales tales como clorofluorohidrocarburos.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar la liberación controlada de un compuesto al cuerpo. Tales formas de dosificación pueden prepararse disolviendo o dispensando el compuesto en el medio apropiado. También pueden usarse potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La tasa puede controlarse tanto proporcionando una membrana de control de la tasa como dispersando el compuesto en una matriz de polímero o gel. Los compuestos descritos en el presente documento también pueden administrarse en forma de liposomas. Como se conoce en la técnica, los liposomas derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias de lípido. Los liposomas se forman por cristales de líquido hidratado mono- o multi-laminar que se dispersan en un medio acuoso. Puede usarse cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposoma pueden contener, además de un compuesto descrito en el presente documento, estabilizadores, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. Se conocen en la técnica métodos de formación de liposomas. Véase, por ejemplo, Prescott (ed.), "Methods in Cell Biology", Volumen XIV, Academic Press, New York, 1976, p. 33 y siguientes.

Un compuesto puede administrarse solo o en combinación con otro inhibidor, tomando la posible terapia de combinación la forma de combinaciones fijas o la administración de un compuesto y otro inhibidor que se escalona o que se administran independientemente entre sí. Es igualmente posible terapia a largo plazo, ya que es terapia adyuvante en el contexto de otras estrategias de tratamiento, como se ha descrito anteriormente. Otros posibles tratamientos son terapia para mantener el estado del paciente después de la regresión tumoral, o incluso terapia quimiopreventiva, por ejemplo, en pacientes en riesgo.

Cantidades eficaces de los compuestos descritos en el presente documento generalmente incluyen cualquier cantidad suficiente para inhibir detectablemente el crecimiento o la proliferación de células de cáncer de mama, o detectar una inhibición o alivio de síntomas de cáncer de mama. La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales de vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del hospedador tratado y el modo particular de administración. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, momento de administración, vía de administración, velocidad de eliminación, combinación de fármacos, y la gravedad de la enfermedad particular que recibe la terapia. La cantidad terapéuticamente eficaz para una situación dada puede ser fácilmente determinada por experimentación rutinaria y está dentro de la experiencia y criterio del profesional clínico habitual.

Según los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, el crecimiento de células de cáncer de mama se reduce o previene en un paciente tal como un ser humano o mamífero inferior administrando al paciente una cantidad de un inhibidor, en tales cantidades y durante un tiempo tal como sea necesario para lograr el resultado deseado. Una "cantidad que es eficaz para inhibir el crecimiento o la proliferación de las células de cáncer de mama" de un compuesto de un inhibidor se refiere a una cantidad suficiente del inhibidor para tratar el crecimiento de células de cáncer de mama, a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones descritos en el presente documento será decidido por el médico adjunto dentro del alcance del criterio médico sensato. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que está tratándose y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración y velocidad de eliminación del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado; y factores similares muy conocidos en las artes médicas.

La dosis del inhibidor de MELK o el inhibidor de FoxM1 que va a administrarse solo o en terapia de combinación a animales de sangre caliente, por ejemplo seres humanos, es preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, por día, dividida preferentemente en 1 a 3 dosis únicas que pueden, por ejemplo, ser del mismo tamaño. Normalmente, los niños reciben la mitad de la dosis del adulto, y así el intervalo de dosis preferencial para el inhibidor en niños es 0,5 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, por día, dividido preferentemente en 1 a 3 dosis únicas que pueden ser del mismo tamaño.

Los términos generales usados anteriormente en este documento y en lo sucesivo preferentemente tienen dentro del contexto de la presente divulgación los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1: Identificación de cinasas oncogénicas que contribuyen a la tumorigénesis de HMEC *in vivo*

La transformación de células humanas primarias con elementos genéticos definidos es un poderoso método para identificar genes específicos o vías que participan en la transformación oncogénica (Hahn et al., 1999; Zhao et al., 2004). Para este fin, se desarrolló un modelo de tumorigénesis *in vivo* que se parece a la patogénesis del cáncer de mama humano. Se estableció previamente un sistema de transformación basado en células epiteliales mamarias humanas (HMEC) adecuado para el estudio de cinasas oncogénicas (Zhao et al., 2003). Para optimizar adicionalmente este sistema, se manipularon HMEC para expresar una forma negativa dominante de p53 (p53DD), NeuT y PI3KCA H1047R. Las células resultantes, llamadas HMECs-DD-NeuT-PI3KCA, se transformaron completamente como se demostró por su capacidad para formar tumores ortotópicos en ratones (Figura 1A). Este modelo se parece a la activación simultánea de ErbB2 y PI3KCA que es predominante en cáncer de mama (Stephens et al., 2012).

A continuación, se utilizó una biblioteca de cinasas basadas en retrovirus (Boehm et al., 2007) y se realizó un cribado de cinasas que puede sustituir PI3KCA oncogénico y cooperar con NeuT para conducir la tumorigénesis en ratones. Se infectaron células HMEC-DD-NeuT con subconjuntos de una biblioteca retroviral de amplio cinoma que codificaba 354 cinasas humanas miristoiladas y proteínas relacionadas con cinasas (Boehm 2007). Se introdujeron 37 subconjuntos de 10-12 ORF de cinasas únicas en células HMECs-DD-NeuT. Las células infectadas se inyectaron entonces en los panículos adiposos mamarios inguinales de ratones sin pelo, y se siguieron los ratones receptores para la formación de tumores. Cinasas en 12 de los 37 conjuntos indujeron la formación de tumores con latencias de 2-4 meses. Se extrajo ADN genómico de especímenes de tumor recogidos y se infectaron las células antes de la inyección. Se usó PCR cuantitativa para determinar la abundancia relativa de cada cinasa en el conjunto candidato en los tumores. En total, se encontró que veintiséis cinasas se enriquecieron específicamente durante el desarrollo de tumores (Figura 2A, 2B). Varias cinasas que emergieron como resultados positivos han estado previamente implicadas como proto-oncogenes o genes asociados al cáncer, tales como el inhibidor de la subunidad épsilon de la cinasa kappa-B del factor nuclear (IKBKE) (Boehm 2007), reordenada durante la transfección (RET) (Takahashi, 1985), épsilon de caseína cinasa 1 (CSNK1E) (Kim 2010), serina/treonina cinasa 6 relacionada con NIMA (NEK6) (Nassirpour et al., 2010) y cinasa 1 de tipo polo (Plk1) (Liu et al., 2006).

Ejemplo 2: MELK se expresa altamente en exceso en cáncer de mama y predice claramente malos desenlaces

Uno de los resultados positivos de alta puntuación del cribado genético descrito en el Ejemplo 1 fue la *cinasa* embrionaria materna de la cremallera de leucina (MELK) (Figura 2A), un miembro atípico de la familia de serina/treonina cinasa AMPK (Lizcano et al., 2004). Aunque se sabe poco sobre las funciones biológicas exactas de MELK, esta cinasa se expresa frecuentemente en exceso en una variedad de tumores (Gray et al., 2005). Sorprendentemente, cuando los presentes inventores analizaron la expresión de MELK en el conjunto de datos de cáncer de mama de The Cancer Genome Atlas (TCGA) (Koboldt et al., 2012), una gran cohorte que consistía en 392 carcinomas de mama ductales invasivos y 61 muestras de mamas normales, el nivel de transcrito de MELK era aproximadamente 8 veces más alto en cánceres de mama en comparación con sus homólogos normales (Figura 2A). El valor de p para esta expresión diferencial ($4,6 \times 10^{-54}$) pone a MELK como un gen expresado en exceso del 1 % superior en cáncer de mama (Figura 2A). La expresión en exceso de MELK en carcinoma de mama con respecto a mamas normales se confirmó adicionalmente analizando otros dos conjuntos de datos independientes (Figura 4A; Richardson et al., 2006; Ma et al., 2009).

Para conocer más de la posible relevancia de la expresión de MELK en exceso para el cáncer de mama, se analizó la expresión de MELK para la correlación con el estado de enfermedad. Analizando los datos de expresión génica a través de cinco cohortes grandes independientes que hacen un total de más de 1500 pacientes (Desmedt et al., 2007; Hatzis et al., 2011; Schmidt et al., 2008; Wang et al., 2005; tabla S1), se encontró que la expresión de MELK más alta estaba fuertemente asociada a mayor grado histológico de cáncer de mama (Figura 2B, 4B); los valores de p para esta correlación se sitúan todos en el 1 % superior de entre los 12.624 totales o más genes medidos. Véanse también las Figuras 14, 15)

También se examinó la expresión de MELK para determinar si la expresión de MELK se correlacionaba con reparación metastásica. Se analizaron tres cohortes independientes en las que se siguieron los pacientes con cáncer de mama de etapa temprana para supervivencia sin metástasis y no habían recibido tratamiento sistémico

adyuvante después de la cirugía (cohortes de van 't Veer, Wang y Schmidt; Tabla S1). En las tres cohortes, la alta expresión de MELK estuvo fuertemente asociada a metástasis previas en mujeres inicialmente diagnosticadas con tumores negativos para ganglios linfáticos (todos los valores de $p < 0,001$, razones de riesgo > 2 ; Figura 3C, 4C). Se analizaron adicionalmente dos cohortes donde la mayoría de los pacientes tenían cáncer de mama de gran malignidad y positivo para los ganglios linfáticos y casi todos los pacientes recibieron quimioterapia neoadyuvante y/o terapia hormonal (cohortes de Hatzis, Loi; Tabla S1 más adelante). Nuevamente, la alta expresión de MELK predijo con robustez la reaparición de metástasis (ambos valores de $p < 0,001$, razones de riesgo > 2 ; Figura 2C). Así, la expresión de MELK en exceso es un claro marcador de predicción para metástasis de cáncer de mama independientemente de la quimioterapia o terapia hormonal. El análisis también indica que el cáncer de mama con alta expresión de MELK está asociado a tumor maligno alto y es menos sensible a las terapias para el cáncer de mama convencionales.

Se analizó la expresión de MELK para el valor predictivo en la supervivencia de pacientes con cáncer de mama. En cinco cohortes grandes independientes donde se siguieron más de 1100 pacientes totales para supervivencia global (Desmedt et al., 2007; Esserman et al., 2012; Kao et al., 2011; Pawitan et al., 2005; van de Vijver et al., 2002; Tabla S1), la alta expresión de MELK se correlacionó fuertemente con la elevada tasa de mortalidad (todos los valores de $p < 0,05$, razones de riesgo > 2) (Figura 2D, 4D). Juntos, estos datos implican a MELK como un robusto indicador de pronóstico, que identifica pacientes con cáncer de mama con grado histológico más alto de enfermedad, elevada probabilidad de metástasis y tasas de supervivencia global más bajas.

Tabla S1

Tabla S1 Conjuntos de datos de la expresión génica de cáncer de mama usados en este estudio (suplemento para la Figura 2, 4, 7C, 137C)		
	n	Referencias
Para comparar la expresión de MELK en	Mama normal	
	frente a carcinoma	
TCGA_mama	61 frente a 392	Koboldt et al., (2012) Nature
Richardson_mama	7 frente a 40	Richardson et al., (2006) Cancer Cell
Ma_mama	14 frente a 18	Ma et al., (2009) Breast Cancer Res
Para el análisis del grado de enfermedad		
Desmedt_mama	198	Desmedt et al., (2007) Clin Cancer Res
Schmidt_mama	200	Schmidt et al., (2008) Cancer Res
Bittner_mama	336	sin publicar
Hatzis_mama	508	Hatzis et al., (2011) JAMA
Wang_mama	286	Wang et al., (2005) Lancet
Para el análisis de la supervivencia sin metástasis		
Schmidt_mama	200	Schmidt et al., (2008) Cancer Res
Loi_mama	87	Loi et al, (2007) J Clin Oncol
van 't Veer_mama	117	van't Veer et al., (2002) Nature
Wang_mama	286	Wang et al., (2005) Lancet
Hatzis_mama	508	Hatzis et al., (2011) JAMA
Para el análisis de supervivencia global		
van de Vijver_mama	295	van de Vijver et al., (2002) N Engl J Med
Desmedt_mama	198	Desmedt et al., (2007) Clin Cancer Res
Esserman_mama -	130	Esserman et al., (2012) Breast Cancer Res Treat
Pawitan_mama -	159	Pawitan et al., (2005) Breast Cancer Res
Kao_mama	327	Kao et al., (2011) BMC Cancer
Para el análisis correlativo de expresión génica		
TCGA_mama	392	Koboldt et al., (2012) Nature
Bittner_mama	261	sin publicar
van de Vijver_mama	295	van de Vijver et al., (2002) N Engl J Med
Hatzis_mama	508	Hatzis et al., (2011) JAMA

Ejemplo 3: Expresión en exceso de MELK en diferentes subtipos de cáncer de mama

Dada la heterogeneidad del cáncer de mama, la expresión de MELK se analizó en diferentes subtipos de cáncer de mama como se define por la pauta de expresión génica (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001). Se caracterizaron muestras en múltiples conjuntos de datos de cáncer de mama por el distintivo del gen PAM50 (Parker et al., 2009).

En cuatro cohortes independientes que hacían un total de más de 1200 pacientes, se observó un patrón de expresión de MELK sorprendentemente similar entre estos subtipos diferentes (Figura 3E, 4E). Subtipos de tipo luminal A y normal presentaron la expresión más baja de MELK. Los tumores luminales B, que tienen una expresión más baja de genes específicos de luminales (Solie et al., 2001) y tumores enriquecidos en HER2, tuvieron expresión de MELK más alta que los tumores de tipo luminal A o normal ($p < 0,0001$). Finalmente, los cánceres de mama de tipo basal (BBC) mostraron la expresión de MELK más alta de entre todos los subtipos ($p < 0,0001$). Estas observaciones indican un patrón de que la expresión de MELK se correlaciona negativamente con la expresión de marcadores luminales. De hecho, se encontró una significativa correlación inversa entre la expresión de MELK y el receptor de estrógeno (ER o ESR1) (Figura 3F, 4F, 14A).

Una clasificación alternativa de cánceres de mama usa la expresión de ER/PR y HER2. El cáncer de mama triple negativo (CMTN), un subtipo que carece de expresión de ER/PR y HER2, se solapa en gran medida con el cáncer de mama de tipo basal (Foulkes et al., 2010; Rakha et al., 2008.). Debido a que la clasificación por subtipo como CMTN ha sido rutinariamente usada en la clínica para el diagnóstico y la selección de estrategias de tratamiento, se examinó la correlación de la expresión de MELK con esta clasificación por subtipo alternativa. En dos cohortes independientes (Tabla S1), se agruparon muestras en subtipos basándose en la expresión de ER/PR y HER2. De hecho, el nivel de expresión de MELK es el más alto en CMTN, medio en cánceres de mama HER2+, y el más bajo en ER/PR+ (Figura 4G). Juntos, estos datos indican que MELK se expresa diferencialmente en exceso en CMTN o BBC.

Ejemplo 4: La expresión en exceso de MELK muestra una robusta actividad oncogénica

El significativo valor pronóstico de MELK junto con su marcada expresión en exceso en cáncer de mama (especialmente de tipo basal) sugirió que MELK podría desempeñar una función crucial en la oncogénesis. Como solo se han identificado algunas mutaciones en MELK en cánceres humanos, se supuso que la expresión en exceso de MELK no mutante era suficiente para la oncogénesis. Primero, confirmación de que la expresión en exceso de MELK puede promover la formación de tumores en células HMEC-DD-NeuT, se probó el sistema modelo usado en el cribado de tumorigénesis inicial. Se volvieron a manipular células HMEC-DD-NeuT para expresar MELK no mutante (wt-) o miristoilada (mir-) (nota: las cinasas en el cribado inicial estuvieron miristoiladas (Boehm et al., 2007)). Mientras que las células HMEC-DD-NeuT que expresan el vector vacío dejaron de formar tumores en ratones, la expresión en exceso de WT- o mir-MELK en estas células presentó la formación de tumores con el 100 % de penetrancia en el plazo de dos meses (Figura 5A).

Para determinar si MELK tiene una capacidad transformante "autónoma" que es independiente de ErbB2, se usó un sistema de transformación en fibroblasto de ratón (Rat1) en el que un único oncogén es suficiente para lograr la transformación de tumores malignos de células Rat1 que expresan p53DD (Rat1-DD) (Zhao et al., 2004). Se demostró recientemente que la expresión de un PI3KCA H1047R oncogénico en ausencia de NeuT fue suficiente para inducir la formación de tumores en Rat1-DD (Ni et al., 2012). Los presentes inventores manipularon células Rat1-DD que expresaban MELK (Rat1-DD-MELK), o PI3KCA H1047R (Rat1-DD-PI3KCA H1047R) como control positivo (Figura 3B). Las células Rat1-DD que expresaban un vector vacío dejaron de crecer como colonias en agar blando o de formar tumores en ratones. Sorprendentemente, células Rat1-DD-MELK presentaron una actividad transformante comparablemente robusta a la de la célula Rat1-DD-PI3KCA H1047R, como se demuestra por tanto el crecimiento de colonias *in vitro* como la formación de tumores *in vivo* (Figura 2C, 2D).

Finalmente, para determinar si la actividad de cinasa de MELK es esencial para su potencial transformante, se introdujeron formas catalíticamente inactivas de MELK, D150A o T167A (Lizcano et al., 2004; Vulsteke et al., 2004), en células Rat-DD. A diferencia de las células Rat1-DD-MELK, tanto las células Rat1-DD-MELK-D150A como Rat1-DD-MELK-T167A presentaron solo crecimiento limitado en agar blando o en ratones (Figura 3E, 3F, 3G). Juntos, estos estudios indican que MELK puede ser un conductor oncogénico muy potente cuando se expresa aberrantemente en exceso y que este potencial oncogénico se basa en la actividad de cinasa de MELK.

Ejemplo 5: MELK es crítica para el potencial oncogénico de células de BBC tanto *in vitro* como *in vivo*

El potencial oncogénico de MELK condujo a la hipótesis de que MELK podría ser esencial para la proliferación de BBC, el subtipo de cáncer de mama donde MELK se encontró que se expresaba al nivel más alto (Figura 3E, 14). Para estos estudios, se usaron un conjunto de líneas de células de cáncer de mama que imitan los subtipos moleculares encontrados en tumores clínicos (Neve et al., 2006). Estas células han sido ampliamente caracterizadas y han sido previamente usadas para desarrollar terapias específicas de subtipo. Las líneas celulares correspondientes a BBC presentaron alto nivel de expresión de MELK. (Figura 15B). En el conjunto de datos de Neve, las 23 células de BBC mostraron un aumento significativo en la expresión de MELK en comparación con las 24 células luminales (Figura 6A). Cuando las líneas celulares se agruparon por expresión de receptores de hormona (ER/PR) y HER2, las 21 líneas de células de cáncer de mama triple negativo expresaron MELK a un nivel más alto que las células ER/PR+ (Figura 7A). Estos resultados están de acuerdo con el patrón de expresión de MELK en cáncer de mama humano (Figura 3E, 4E, 4F). La abundancia de proteína de MELK es mucho más alta en células de BBC en comparación con células luminales (MCF7 y T47D) como se confirmó por inmunotransferencia (Figura 4B). Estas líneas celulares proporcionan así una excelente plataforma para evaluar las funciones celulares de MELK.

5 Para examinar la función de MELK en la proliferación de estas células, se usó una técnica de inactivación génica condicional en la que la transcripción de ARNhp (y, por consiguiente, el silenciamiento de genes diana) se induce solo tras la exposición a doxiciclina (Wiederschain et al., 2009). Entre los múltiples ARNhp inducibles que se generaron para elegir como diana MELK, se identificaron cuatro secuencias diana de MELK y se encontró que los ARNhp que se dirigieron a las secuencias diana silenciaron eficientemente la expresión de MELK e inhibieron el crecimiento celular en células tratadas con doxiciclina (Figura 6C, 6D, 7B, 16, 17, 19). Las secuencias diana de MELK y los cebadores directos e inversos para preparar los ARNhp se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

ID de MELK	Secuencia diana de MELK	SEQ. ID. NO.
MELK sh-413	GAGAGCTGTTTGACTATATAA	SEQ. ID. NO: 1
MELK-1805	GACTAAAGCTTCACTATAATG	SEQ. ID. NO: 2
shMELK 1	GGTGTGATACAGCCTACATAA	SEQ. ID. NO: 3
MELK sh 1591 y shMELK2	GCCTGAAAGAACTCCAATTA	SEQ. ID. NO: 4
Oligonucleótido	Secuencia	
MELK sh-413 directo	CCGGGAGAGCTGTTTGACTATATAACTCGAGTTATATAGTCAAA CAGCTCTCTTTTTTG	SEQ. ID. NO: 5
MELK sh-413 inverso	AATTA AAAAGAGAGCTGTTTGACTATATAACTCGAGTTATA TAGTCAAACAGCTCTCT	SEQ. ID. NO: 6
MELK-1805 directo	CCGGGACTAAAGCTTCACTATAATGCTCGAGCATTATAGTGAAG CTTTAGTCTTTTTTG	SEQ. ID. NO: 7
MELK-1805 inverso	AATTA AAAAGACTAAAGCTTCACTATAATGCTCGAGCATT ATAGTGAAGCTTTAGTCT	SEQ. ID. NO: 8
shMELK1 directo	CCGGGGTGTGATACAGCCTACATAACTCGAGTTATGTAGGCTG TATCACACCTTTTTG	SEQ. ID. NO: 9
shMELK1 inverso	AATTC AAAAGGTGTGATACAGCCTACATAACTCGAGTTATGTA GGCTGTATCACACC	SEQ. ID. NO: 10
MELK sh-1591 y shMELK2 directo	CCGGGCCTGAAAGAACTCCAATTACTCGAGTAATTGGAGTTTC TTTCAGGCTTTTTG	SEQ. ID. NO: 11
MELK sh-1591 y shMELK2 inverso	AATTC AAAAGCCTGAAAGAACTCCAATTACTCGAGTAATTGG AGTTTCTTTCAGGC	SEQ. ID. NO: 12

10 Se introdujeron establemente shMELK1, shMELK2, MELK sh-413, MELK sh-1591 y MELK sh-1805 en células de cáncer de mama basal, además de en dos líneas celulares luminales, y se examinó la proliferación celular tras la inducción del ARNhp. Como se muestra, la inducción de la inactivación de MELK mediante doxiciclina alteró fuertemente el crecimiento de células de BBC que incluyen BT549, MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MDA-MB-436
15 (Figura 6C, 7A, 16-18); por el contrario, las dos líneas celulares luminales, MCF7 y T47D, que tienen expresión significativamente más baja de MELK (Figura 6B, 19), se protegieron de la inducción del silenciamiento de MELK (Figura 6D, 19). Para confirmar que estos efectos son debidos a la inactivación específica de MELK, se rescató la expresión de MELK introduciendo establemente una MELK inducible por doxiciclina y resistente a shMELK (MELK-R) (Figura 6E, panel izquierdo; 7B). En células MDA-MB-468 que expresan shMELK, se restauró la proliferación celular al nivel normal cuando se rescató la expresión de MELK (Figura 6E, paneles central y derecho). De forma interesante, una versión resistente a ARNhp pero inactiva para cinasa de MELK, MELK-R (T167A), dejó de restaurar la proliferación celular (Figura 6E), que indica que la actividad de MELK de cinasa es crítica para la proliferación de células de BBC.

25 También se examinó el requisito de MELK en células de BBC para su crecimiento oncogénico. Primero, *in vitro*, tanto MDA-MB-468 de control como células MDA-MB-231 crecieron fácilmente en colonias en agar blando. A diferencia, la inducción de la inactivación de MELK en estas células por doxiciclina causó una inhibición casi completa en la formación de colonias (Figura 8A, 17, 18). A continuación, se examinó si MELK era esencial para la tumorigénesis *in vivo* de células de BBC. Se trasplantaron células de cáncer de mama con shMELK estable en los
30 panículos adiposos mamarios de ratones inmunodeprimidos para permitir la formación ortotópica de tumores. En ratones que llevan tumores establecidos, la administración de doxiciclina indujo la eficiente supresión de MELK (Figura 9), que valida la idoneidad del sistema de ARNhp inducible *in vivo*. Tratar ratones con doxiciclina

inmediatamente tras el trasplante inhibió fuertemente la formación de tumores ortotópicos (Figura 8B, 8C), que demuestra que MELK se requiere para que estas células de BBC crezcan *in vivo*. Para examinar adicionalmente si MELK se requiere para el mantenimiento de tumores de xenoinjerto establecidos *in vivo*, ratones que llevan tumores de xenoinjerto derivados de células de cáncer de mama de tipo basal o luminales se trataron con doxiciclina. Sorprendentemente, la regulación por disminución de MELK remitió sustancialmente los tumores que surgieron de células de BBC, pero tiene poco efecto sobre los tumores derivados de células cancerosas luminales (Figura 8D-G, Figura 9). Juntos, estos datos indican que MELK es selectivamente requerido para la proliferación de células de BBC tanto *in vitro* como *in vivo*.

10 Ejemplo 6: La pérdida de MELK produce mitosis defectuosa y muerte celular en células de BBC

Para entender los mecanismos subyacentes a la función de MELK en células de BBC, se examinó el agotamiento de MELK para el impacto en diversos procesos celulares. En células tratadas con doxiciclina, se observaron coherentemente marcadores apoptóticos, que incluyen caspasa 3 escindida, PARP escindida y la fragmentación de ADN (Figura 10A, 10B, Figura 11). zVad, un inhibidor de pan-caspasa, redujo significativamente la muerte celular inducida por la inactivación de MELK, que indica una función activa de caspasas en la ejecución de la muerte celular tras el agotamiento de MELK (Figura 10C, Figura 11B). En particular, la muerte celular inducida por la inactivación de MELK solo ocurrió en células de BBC, pero no en células tumorales luminales, tales como MCF7 (Figura 10D, Figura 11C), proporcionando una explicación plausible para el requisito selectivo de MELK en células de cáncer de mama de tipo basal, pero no luminal.

En paralelo, se investigó el efecto del agotamiento de MELK sobre el ciclo celular. El inactivar MELK en células tras el tratamiento con doxiciclina indujo una acumulación obvia de células con contenido de ADN de 4n (Figura 10E, Figura 11D, paneles izquierdo y central), que indica una inducción de la parada de G2/M. De acuerdo con esto, las células expuestas a doxiciclina tienen elevados marcadores de mitosis, tales como ciclina B1, cinasa aurora A (Figura 10E, Figura 11D, paneles derechos). De forma interesante, la doxiciclina indujo un aumento de casi dos veces en el porcentaje de células con dos o más núcleos como se muestra en las células de las que se obtuvieron imágenes (Figura 10F, Figura 11E), que indica un fracaso de la citocinesis. Además, células con agotamiento de MELK presentaron una variedad de aberraciones mitóticas, tales como husos monopolares, centrosomas erróneamente localizados, segregación errónea de cromátidas hermanas y división asimétrica (Figura 10G).

Se examinó la muerte celular y mitosis defectuosa simultánea tras la inactivación de MELK para asociación funcional. Usando microscopía de lapso de tiempo, células que expresan GFP-histona 2B, un marcador para la dinámica de cromosomas en células vivas (Kanda et al., 1998). Cuando la expresión de MELK se regula por disminución, las células con núcleos dobles en vez de células vecinas con núcleo individual experimentaron muerte celular (Figura 10H, panel central). Otro escenario en presencia de doxiciclina, células con una placa de metafase aparente fueron incapaces de progresar hacia anafase, terminando en muerte celular (Figura 10H, panel inferior). Por el contrario, la célula de control progresó fácilmente de metafase a anafase (Figura 10H, panel superior). Juntos, estos datos sugieren un modelo en el que células de BBC se basan en MELK para la apropiada mitosis; la inhibición de MELK en estas células produce mitosis alterada y, por consiguiente, muerte celular.

Ejemplo 7: FoxM1 se expresa en exceso en BBC y regula la expresión de MELK

Se examinó MELK para determinar si MELK es una cinasa mitótica en células de BBC. MELK se acumuló altamente en células mitóticas, que se enriquecieron mediante la parada de la prometafasa inducida por nocodazol (Figura 12A, Figura 13A). Cuando las células paradas fueron liberadas de nocodazol y progresaron fácilmente en la fase G1, la abundancia de la proteína MELK disminuyó espectacularmente (Figura 12A, Figura 13A). Este patrón de expresión es típico de aquellos factores mitóticos clásicos, tales como ciclina B1 y cinasas aurora (Figura 12A, Figura 13A), sugiriendo que MELK es una cinasa mitótica.

Se examinó la regulación de MELK por FoxM1, un regulador maestro de una variedad de genes que son esenciales para la mitosis (Laoukili et al., 2005; Wang et al., 2005). De forma interesante, al igual que MELK, FoxM1 es el más altamente expresado en los subtipos BBC o CMTN (Figura 12B, Figura 13B, 13C). Además, se observó una correlación extremadamente estrecha entre la expresión de FoxM1 y de MELK en múltiples cohortes de gran tamaño (Figura 12C, Figura 13D). La inhibición de FoxM1 mediante el silenciamiento génico usando ARNiP (SEQ ID NO: 31) o un inhibidor químico (tiostreptona) redujo la abundancia de MELK (Figura 12D, 12E, Figura 13E). Además, los presentes inventores encontraron que el promotor de MELK contenía un motivo de unión a FoxM1 putativo (SEQ ID NO: 45, mostrado en la FIG. 12F) (Wierstra y Alves, 2007) y un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina usando anticuerpo contra FoxM1 recuperado de la región promotora de MELK con el sitio de unión putativo (Figura 12E, 12F). Juntos, estos estudios identifican FoxM1 como factor de transcripción que se enriquece en BBC y regula MELK, proporcionando un mecanismo molecular subyacente a la expresión en exceso de MELK en BBC.

Procedimientos experimentales

Plásmidos

5 Se amplificó MELK humana usando el ADN de molde depositado en la biblioteca de cinasas descrita, y se clonó en el vector retroviral pWZL (Zhao et al., 2003), en el que la expresión del gen diana es conducida por la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney. Se generaron mutantes de MELK (D150A, T167A, o MELK resistente a shMELK con mutaciones silenciosas) mediante mutagénesis dirigida al sitio Quickchange XL (Stratagene). Los cebadores se enumeran en la Tabla S2 a continuación. Para construir un sistema de expresión de genes inducible por tetraciclina, se amplificó GFP o MELK mutada usando los cebadores enumerados en la Tabla S2. Los productos de PCR se digirieron con AgeI y PacI, y se ligaron con pLKO-TREX digerido (Wee et al., 2008).

15 Para la construcción de pWzI-H2B-GFP, se amplificó histona 2B humana usando el ADN genómico de células HEK293T como moldes. Cebadores para la clonación se enumeran en la Tabla S2. Se ligaron los productos de PCR tras la digestión con BamHI y XhoI con pWzI-GFP digerido. Para generar pLKO-tet-on-ARNhp que se dirigen a MELK humana, se diseñaron oligonucleótidos y se sintetizaron (IDT). Tras la hibridación, los oligonucleótidos bicatenarios se ligaron directamente con el vector pLKO que se digirió con AgeI y EcoRI. Las secuencias para la combinación, shMELK1, shMELK2 se enumeran en la Tabla S2. Se generaron retrovirus transfectando células HEK293T con plásmidos pWzI y ADN de encapsidación. Normalmente, se usaron 1,6 µg de ADN de pWzI, 1,2 µg de pCG-VSVG y 1,2 µg de pCG-gap/pol, 12 µl de lípido de Metafectene Pro (Biontex); se diluyeron ADN y lípido en 300 µl de PBS respectivamente y se mezclaron; y tras 15 min de incubación, se añadieron a una placa de 6 cm que se sembró con 3 millones de células HEK293T un día antes. El sobrenadante viral se recogió 48 h y 72 h después de la transfección. Después de filtrar el sobrenadante a través de una membrana de 0,45 µm, se añadió a células diana en presencia de 8 µg/ml de polibreno (Millipore). Se generaron lentivirus con un enfoque similar con la excepción de células que se transfectaron con 2 µg de ADN de pLKO, 1,5 µg de pCMV-dR8.91 y 0,5 µg de pMD2-VSVG. Las células se seleccionaron con antibióticos a partir de 72 h después de la infección inicial. Se usaron puromicina y blasticidina a las concentraciones finales de 1,5 µg/ml y 4 µg/ml, respectivamente.

Tabla S2

Tabla S2 Oligonucleótidos		SEQ. ID. NO.
Cebadores de GFP para construir pLKO-TREX-GFP		
Directo	5'-gatcaccggatggtgagcaaggggcgagga-3'	SEQ. ID. NO: 13
Inverso	5'-gatcttaattaattactgtacagctcgtcca-3'	SEQ. ID. NO: 14
Cebadores de MELK para construir pLKO-TREX-Flag-MELK		
Directo	5'-gatcaccgggtgccaccatggactacaagacgatgacgacaagaaagattatgatgaactct-3'	SEQ. ID. NO: 15
Inverso	5'-gatcttaattaattataccttgcagctagataggat-3'	SEQ. ID. NO: 16
Cebadores de histona 2B para construir pWzI-H2B-GFP		
Directo	5'-gatcggatccgccaccatgcctgagccagccaagtc-3'	SEQ. ID. NO: 17
Inverso	5'-gatcctcgagcttggagctggtgtacttg-3'	SEQ. ID. NO: 18
Cebadores de mutagénesis para MELK (D150A)		
Directo	5'-tatcataaattaagctgattgccttggctctgtgcaaaacc-3'	SEQ. ID. NO: 19
Inverso	5'-gggttttgcacagagaccaaaggcaatcagcttaattatgata-3'	SEQ. ID. NO: 20
Cebadores de mutagénesis para MELK (T167A)		
Directo	5'-aggattaccatcta caggcatgctgtgggagtctg-3'	SEQ. ID. NO: 21
Inverso	5'-cagactcccacagcatgcctgtagatggtaacct-3'	SEQ. ID. NO: 22
Cebadores de mutagénesis para MELK resistente a shMELK2		
Directo	5'-caaaagctagaaccagtgccctgaaggagacacctataaaataaccagtaaattcaacag-3'	SEQ. ID. NO: 23
Inverso	5'-ctgttgaatttactggtatttaataaggtgtctcctcaggcactggtttctagctttg-3'	SEQ. ID. NO: 24
Oligonucleótido para construir pLKO-tet-on-combinado		
Directo	5'-ccgggtggactctgaaagtactatctcgagatagtagtctcaagagtcacttttg-3'	SEQ. ID. NO: 25
Inverso	5'-aattaaaaagtgactcttgaagtagtactatctcgagatagtagtctcaagagtcacac-3'	SEQ. ID. NO: 26
Oligonucleótido para construir pLKO-tet-on-shMELK1		
Directo	5'-ccgggtgtgtgatacagcctacataaactcgagttatgtaggctgtatcacaccttttg-3'	SEQ. ID. NO: 9
Inverso	5'-aattcaaaaaggtgtgatacagcctacataaactcgagttatgtaggctgtatcacacc-3'	SEQ. ID. NO: 10

30

Oligonucleótido para construir pLKO-tet-on-shMELK2		
Directo	5'-ccgggacctgaaagaaactccaattactcgagtaattggagttcttcaggcttttg-3'	SEQ. ID. NO: 11
Inverso	5'-aattcaaaaagcctgaaagaaactccaattactcgagtaattggagttcttcaggc-3'	SEQ. ID. NO: 12
Oligonucleótido para construir pLKO-tet-on-shFoxM1		
Directo	5'-ccggggaccactttccctactttaactcgagttaaagttagggaaagtggccttttg-3'	SEQ. ID. NO: 27
Inverso	5'-aattcaaaaaggaccactttccctactttaactcgagttaaagttagggaaagtggc-3'	SEQ. ID. NO: 28
siFoxM1	ggaccacuuuuccuacuuu (Fu et al., 2008; Wang et al., 2005)	SEQ. ID. NO: 29
Cebadores usados en experimentos de inmunoprecipitación de cromatina		
MELK-Fwr	5'-aggctgaggcgggaggatcgctt-3'	SEQ. ID. NO: 30
MELK-rv	5'-gtgtgccacgaggaataagaacc-3'	SEQ. ID. NO: 31
CDC25B-Fwr	5-aagagcccatcagttccgcttg-3'	SEQ. ID. NO: 32
CDC25B-Rv	5-aagagcccatcagttccgcttg-3'	SEQ. ID. NO: 33
Cebadores usados en experimentos de q-PCR		
MELK-Fwr	5'-aaaccaagggtacaagga-3'	SEQ. ID. NO: 34
MELK-rv	5'-acagtatgcccatgctcca-3'	SEQ. ID. NO: 35
CENPA-Fwr	5'-cttctcccatcaacacagtcg-3'	SEQ. ID. NO: 36
CENPA-rv	5'-tgcttctgctgcctctttagg-3'	SEQ. ID. NO: 37
BIRC5-Fwr	5'-tcaaggaccaccgcctctcta-3'	SEQ. ID. NO: 38
BIRC5-rv	5'-tgaagcagaagaacactgggc-3'	SEQ. ID. NO: 39
BIRC5-rv	5'-tgaagcagaagaacactgggc-3'	SEQ. ID. NO: 39
MELK y MELK-R secuencias diana		
MELK	TGCCTGAAAGAACTCCAATTA	SEQ. ID. NO: 40
MELK-R	TGCCTGAAGGAGACCTATTA	SEQ. ID. NO: 41
Promotor de MELK humano		
	ACCCACAAATAATTTAG	SEQ. ID. NO: 42
Sitio consenso de FoxM1		
	A ^C /TAAA ^C /TAAANN	SEQ. ID. NO: 43

Cultivo celular

- 5 Se mantuvieron células epiteliales mamarias humanas (HMEC) en DMEM/F-12 complementado con EGF (10 ng/ml), insulina (10 µg/ml) e hidrocortisona (0,5 µg/ml) bajo 5 % de CO₂ y 37 °C. Se mantuvieron células Rat1 y HEK293T en DMEM complementado con 10 % de FBS (Invitrogen). Todas las líneas de células de cáncer de mama (MCF7, T47D, MDA-MB-468, MDA-MB-231, MDA-MB-436, HCC1197, BT549) se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con 10 % de FBS. Para células establemente introducidas con genes/ARNhp inducibles por tetraciclina, se usó FBS autorizado por Tet (Clontech).

Ensayo de proliferación celular

- 15 Normalmente, se sembraron células de cáncer de mama en placas de 12 pocillos (1-2x10⁴) en 1 ml de medio. Al día siguiente, se añadió a los pocillos 110 µl de medio sin o con 1 µg/ml de doxíciclina (para alcanzar una concentración final de 100 ng/ml), que se repitió cada dos días. Seis días después del tratamiento inicial, las células se fijaron con formaldehído, y se tiñeron con cristal violeta (0,05 %, peso/volumen), una tinción citoquímica de unión a cromatina. Las placas se lavaron ampliamente, y se obtuvieron imágenes con un escáner de cama plana. Para la cuantificación de la tinción, se añadió 1 ml de 10 % de ácido acético a cada pocillo para extraer el colorante. La absorbancia se midió a 590 nm con 750 nm como referencia.

Ensayo de formación de colonias

- 25 Los ensayos se realizaron normalmente en placa de 12 pocillos, a menos que se mencione lo contrario. Se suspendieron células en medio que contenía 0,3 % de agar y se sembraron en una capa de 0,6 % de agar (para cada pocillo, 4.000 células en 800 µl de medio, 1 ml de agar de fondo). Se añadió medio a los pocillos (sin o con 100 ng/ml de doxíciclina) al día siguiente. Tres semanas después de la siembra, las colonias se fijaron con formaldehído y se obtuvieron imágenes. El número de colonias en cada pocillo se cuantificó usando ImageJ (Institutos Nacionales de Salud).

30

Estudios de xenoinjerto de tumor

Todos los estudios de xenoinjerto se realizaron según las pautas de uso de animales de los Institutos Nacionales de Salud y con protocolos autorizados por el Comité de Cuidado y Uso de animales del Instituto del Cáncer Dana-Farber. Los ratones receptores usados fueron NCR-nude (CrTac:Ncr-Foxn1nu, Taconic). Las células se resuspendieron en 40 % de matriz de membrana basal Matrigel, libre de LDEV (BD Biosciences) y se dejaron sobre hielo hasta la inyección. Para el trasplante de líneas celulares humanas, los ratones se irradiaron con y con una dosis única de 400 rads el mismo día de la inyección. Los ratones se anestesiaron por inhalación de isoflurano, y se inyectaron con 150 µl de células (5×10^6) por sitio. Se midieron los tumores en las dos dimensiones por un compás calibrador. El volumen del tumor se calculó usando la fórmula: $V = 0,5 \times \text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{anchura}$. Todos los datos de xenoinjerto se presentan como media \pm EEM. La comparación entre grupos de tratamiento se realizó usando la prueba de la t de Student bilateral. Los cálculos se realizaron usando o bien Openoffice o GraphPad Prism versión 5.0b

Para el estudio de tumorigénesis, se inyectaron 5×10^6 células HMEC en el panículo adiposo mamario, y 5×10^6 células Rat1 por vía subcutánea. El crecimiento tumoral se monitorizó dos veces a la semana. Se recogieron xenoinjertos de Rat1 tres semanas después de la inyección. Para estudiar el impacto de la inactivación de MELK sobre el crecimiento tumoral, los ratones se clasificaron al azar en grupos en el segunda día de inyección, y se dejaron sin tratar o se trataron con doxiciclina (2 mg/ml en 5 % de dextrosa en agua de beber, se recargó dos veces a la semana) durante la duración del estudio. Se midieron los tumores dos veces a la semana. Para estudiar las funciones de MELK en el mantenimiento del tumor, se clasificaron al azar los ratones con tumores establecidos derivados de inyecciones ortótópicas de células MDA-MB-231, o MDA-MB-468, o MCF-7, o T47D, en dos grupos, recibiendo un grupo doxiciclina en el agua de beber. Los tumores se midieron con compás calibrador dos veces a la semana para monitorizar el efecto de la inactivación de MELK sobre el crecimiento tumoral.

Obtención de imágenes de lapso de tiempo

Se realizó obtención de imágenes de lapso de tiempo en un microscopio invertido motorizado Nikon Ti, que se equipó con un sistema de enfoque perfecto y una cámara de incubación humidificada (37 °C, 5 % de CO₂) (Centro de obtención de imágenes de Nikon, Escuela médica de Harvard). Se sembraron previamente células que expresan establemente H2B GFP en placa de fondo de vidrio de 24 pocillos, y o bien se dejaron sin tratar o se trataron con doxiciclina (100 ng/ml final). Las imágenes se capturaron cada 5 minutos con una lente de objetivo 20x, y una cámara de CCD refrigerada Hamamatsu ORCA-AG. Las imágenes se analizaron usando ImageJ (Institutos Nacionales de Salud).

Análisis de inmunofluorescencia

Se sembraron células sobre cubreobjetos N.º 1,5 (redondos de 12 mm) que se dispusieron previamente en placas de 24 pocillos. Tras la recogida, las células se fijaron con 4 % de formaldehído durante 10 min. Después de lavar, las células se permeabilizaron con 0,1 % de Triton X-100 durante 10 min. Entonces, las células se lavaron y se bloquearon con 1 % de suero bovino durante 30 min antes de incubarse con anticuerpo primario (anti-β-tubulina, N.º 2128, Cell Signaling Technology) preparado en PBS que contenía 1 % de albúmina de suero bovino. Después de incubarse durante la noche a 4 °C, las muestras se lavaron y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (Invitrogen) durante 1 h a temperatura ambiente. Después del amplio lavado, las muestras se secaron y se montaron con reactivo ProLong Antifade (Invitrogen). Las imágenes se adquirieron con un microscopio vertical Nikon 80i en el Centro de obtención de imágenes de Nikon (Escuela médica de Harvard), que está equipado con una cámara monocroma Hamamatsu C8484-03. Se usó ImageJ para el análisis de las imágenes, que incluye fusionar canales con diferentes colores y cultivos.

Inmunotransferencia

Se lisaron células con tampón RIPA (Tris 25 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 1 % de Nonidet P-40, 0,5 % de desoxicolato de sodio y 0,1 % de dodecilsulfato de sodio) complementado con mezcla de inhibidores de la proteasa (Roche) y mezcla de inhibidores de la fosfatasa (Thermo Scientific). Los lisados limpios se analizaron para la concentración de proteína usando el kit BCA (Thermo Scientific). Se resolvió cantidad igual de proteína (10-20 µg) en 8 % o 10 % de SDS-PAGE, y posteriormente se transfirió sobre una membrana de nitrocelulosa o poli(cloruro de vinilideno) (Amersham). La membrana se bloqueó con 5 % de leche desnatada, luego se incubó con anticuerpos primarios durante la noche a 4 °C. Después de lavar, la membrana se incubó con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforo durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces, la membrana se lavó y se barrió con un escáner de infrarrojos Odyssey (Li-Cor Biosciences). Los anticuerpos primarios usados en este estudio incluyen anti-MELK (Epitomics, N.º 2916), anti-α-tubulina (Abcam), anti-ciclina B1 (Millipore), anti-vinculina (Sigma), anti-FoxM1 (Santa Cruz), anti-β-tubulina, anti-fosfo-Akt (S473), anti-fosfo Akt (T308), anti-Akt total, anti-Flag, anti-PARP escindida (Asp214), anti-caspasa 3 escindida, anti-AURKA, anti-AURKB, anti-p27 (todos de Cell Signaling Technology). Los anticuerpos secundarios usados fueron anti-IgG de conejo conjugada con IRDye700 y anti-IgG de ratón conjugada con IRDye800 (Rockland).

Análisis del ciclo celular

Se recogieron células por tripsinación, y se pipetearon repetidamente en suspensión de células sueltas. Después de la centrifugación, las células se fijaron añadiendo 70 % de etanol (-20 °C) gota a gota mientras se agitaba con vórtex. Entonces se tiñeron las células con solución de yoduro de propidio (50 µg/ml, Sigma) que contenía 50 µg/ml de RNasa libre de DNasa (Sigma) y 0,5 % de albúmina de suero bovino (BSA). Después de 30 min de incubación, las muestras se lavaron y se resuspendieron en 0,5 % de BSA. El análisis se realizó en un LSRFortessa (BD Biosciences) en la Instalación central de citometría de flujo de DFCI. Se seleccionaron células sueltas mediante representación FL3-A a FL3-H para excluir residuos celulares y dobletes. Se recogieron al menos diez mil células sueltas para cada muestra.

Inmunoprecipitación de cromatina

Se realizó inmunoprecipitación de cromatina como se describe previamente (Lee et al., 2006). Tras la recogida, se añadió medio en placas de cultivo celular con 16 % de formaldehído (Electron Microscopy Sciences) para alcanzar una concentración final del 1 %, y se extinguió con glicina (125 mM final, incubación de 5 min) después de la incubación a temperatura ambiente durante 10 min. Las células se recogieron por raspado en PBS frío, y se centrifugaron. Se lisaron sedimentos de células con LB1 (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, 10 % de glicerol, 0,5 % de NP-40, 0,25 % de Triton-X-100), luego después de la centrifugación con LB2 (Tris-HCl 10 mM a pH 8,0, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, EGTA 0,5 mM), y otra vez después de la centrifugación se resuspendieron en LB3 (Tris-HCl 10 mM a pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 0,5 mM, 0,1 % de desoxicolato de Na, 0,5 % de N-lauroilsacosina). Las muestras se sonicaron usando un sonicador por cizallamiento de ADN Q800R (Qsonica) al 50 % de amplitud durante 10 min con un pulso de 30 segundos encendido y 30 segundos apagado. Entonces, las muestras se complementaron con 10 % de Triton-X 100 a una concentración final del 1 %, y se centrifugaron a 20.000 x g durante 10 min a 4 °C. Se usaron los lisados limpios para la siguiente inmunoprecipitación, con 50 µl de lisado ahorrado como entrada.

Se lavaron DynaBeads conjugadas con proteína G (Invitrogen) con solución de bloqueo (0,5 % de albúmina de suero bovino en PBS) y se incubaron durante la noche con 5 µg de anti-FoxM1 (SC-502, Santa Cruz Biotechnology), o 5 µg de IgG de conejo en solución de bloqueo, y al día siguiente se lavaron tres veces con solución de bloqueo. Se incubaron los lisados celulares con el anticuerpo/perla magnética, se giraron a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, las perlas se recogieron con soporte magnético y se lavaron seis veces con tampón RIPA (HEPES 50 mM a pH 7,6, LiCl 500 mM, EDTA 1 mM, 1 % de NP-40, 0,7 % de desoxicolato de Na). Después de un único lavado con tampón Tris-EDTA que contenía NaCl 50 mM, se resuspendieron las muestras con tampón de elución (Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, EDTA 10 mM, 1 % de SDS) para la incubación a 65 °C durante la noche. Por tanto, la entrada de 50 µl se mezcló con 150 µl de tampón de elución y se incubó a 65 °C durante la noche para la reticulación inversa. Al día siguiente, se añadió RNasa A a las muestras (0,2 µg/ml final), seguido de incubación durante 1 h a 37 °C. Las muestras se trataron entonces con proteinasa K (0,2 µg/ml final) y se incubaron a 56 °C durante 1 h. Se purificaron ADN con un kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen), y se eluyeron con 30 µl de agua. Se realizó PCR usando Quick-Load Taq 2X mezcla maestra (NEB), usando los cebadores enumerados en la Tabla S2.

Análisis por qRT-PCR

Se extrajo ARN total de células cultivadas con el kit RNeasy Mini (Qiagen), con el uso de la columna de centrifugación QIAshredder para la homogenización y una digestión de DNasa en columna. Se transcribieron de forma inversa dos microgramos de ARN usando un kit de ARN a ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems). Se analizaron cuantitativamente ADNc usando Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en un sistema de PCR en tiempo real ABI7300. Los cebadores usados se enumeraron en la Tabla S2. Las condiciones de ciclado fueron 95 °C durante 15 min, 40 ciclos de 15 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 72 °C. Los valores de Ct se generaron usando los parámetros de análisis por defecto. ΔCT se definió como $Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{actina}}$. $\Delta\Delta CT$ se definió como $\Delta Ct_{\text{muestra tratada}} - Ct_{\text{muestra de control}}$. La cuantificación relativa (RQ) se calculó como $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se realizó el análisis estadístico por la prueba de Student.

Análisis de expresión génica

Se descargaron los datos de la expresión génica de Oncomine (Rhodes et al., 2004). La información de los conjuntos de datos clínicos se enumera en la Tabla S1. Los análisis y figuras se hicieron en GraphPad Prism. En los gráficos de representación de puntos, cada punto indica una muestra individual, con resultados expresados como la mediana con intervalo intercuartílico.

Análisis de supervivencia

Se examinaron cohortes independientes de pacientes con cáncer de mama con datos de supervivencia global o supervivencia sin metástasis disponibles. La información de las cohortes se enumera en la Tabla S1. Se descargaron los datos de expresión de MELK y supervivencia asociada de Oncomine (Rhodes et al., 2004). Para cada cohorte, los pacientes se dividieron en grupos del 60 % superior "MELK alta" y el 40 % inferior "MELK baja"

basándose en la expresión de MELK. Se analizaron curvas de Kaplan-Meier, además de la prueba del rango logarítmico (Mantel-Cox) y la razón de riesgo por GraphPad Prism.

Análisis estadístico

5 Se usaron prueba de la t de Student bilateral y ANOVA (análisis de la varianza) para la comparación diferencial entre dos grupos y entre tres grupos, respectivamente. Se realizaron el análisis de supervivencia y de correlación en GraphPad Prism.

10 Listado de secuencias

<110> Huang, Xizhong
 Zhao, Jean J.
 Min, Junxia
 Wang, Yubao

15

<120> REGULACIÓN DE MELK PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE MAMA

<130> 14293-207

20

<150> US 61/751.703
 <151> 11-01-2013

<160> 43

25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Secuencia diana de MELK

35

<400> 1
 gagagctgtt tgactatata a 21

<210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Secuencia diana de MELK

45

<400> 2
 gactaaagct tcactataat g 21

<210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Secuencia diana de MELK

55

<400> 3
 ggttgatac agcctacata a 21

60

<210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 669 450 T3

	<220>		
	<223> Secuencia diana de MELK		
	<400> 4		
5	gcctgaaaga aactccaatt a	21	
	<210> 5		
	<211> 59		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo sintético		
15	<400> 5		
	cgggagagc tgttgacta tataactoga gttatatagt caaacagctc tctttttg	59	
	<210> 6		
	<211> 58		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso sintético		
25	<400> 6		
	aattaanaag agagctgttt gactatataa ctogagttat atagcaaac agctctct	58	
	<210> 7		
	<211> 59		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo sintético		
35	<400> 7		
	cgggactaa agcttcaacta taatgctoga gcattatagt gaagctttag tctttttg	59	
	<210> 8		
	<211> 58		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso sintético		
45	<400> 8		
	aattaanaag actaaagctt cactataatg ctogagcatt atagtgaagc tttagtct	58	
50	<210> 9		
	<211> 58		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Cebador directo sintético		
	<400> 9		
60	cgggggtgtg atacagccta cataactoga gttatgtagg ctgtatcaca cctttttg	58	

ES 2 669 450 T3

<210> 10
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador inverso sintético
 <400> 10
 10 aattcaaaaa ggtgtgatac agcctacata actcgagtta tgtaggctgt atcacacc 58
 <210> 11
 <211> 58
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo sintético
 20 <400> 11
 ccgggcctga aagaaactcc aattactcga gtaattggag ttctttcag gcttttg 58
 <210> 12
 <211> 58
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso sintético
 30 <400> 12
 aattcaaaaa gctgaaaga aactccaatt actcgagtaa ttggagttc ttcaggc 58
 <210> 13
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo sintético
 40 <400> 13
 gatcaccggt atggtgagca agggcgagga 30
 45 <210> 14
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador inverso sintético
 <400> 14
 55 gatcttaatt aattactgt acagctcgtc ca 32
 <210> 15
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador directo sintético

ES 2 669 450 T3

	<400> 15		
	gatcaccggt gccacatgg actacaaaga cgatgacgac aagaaagatt atgatgaact		60
	tct		63
5	<210> 16 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Cebador inverso sintético		
	<400> 16 gatcttaatt aattatacct tgcagctaga taggat	36	
15	<210> 17 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Cebador directo sintético		
	<400> 17 gatcggatcc gccacatgc ctgagccagc caagtc	36	
25	<210> 18 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Cebador inverso sintético		
	<400> 18 gatcctcgag ctggagctg ggtacttgg	30	
40	<210> 19 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Cebador directo sintético		
45	<400> 19 tatcataaat taaagctgat tgccttggc ctctgtgcaa aacct	45	
50	<210> 20 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Cebador inverso sintético		
55	<400> 20 gggttttga cagagaccaa aggcaatcag cttaattta tgata	45	
60			

ES 2 669 450 T3

<210> 21
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador directo sintético
 <400> 21
 10 aggattacca tctacaggca tgctgtggga gtctg 35
 <210> 22
 <211> 35
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso sintético
 20 <400> 22
 cagactccca cagcatgcct gtagatggta atcct 35
 <210> 23
 <211> 60
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo sintético
 30 <400> 23
 caaaagctag aaaccagtgc ctgaaggaga cacctattaa aataccagta aattcaacag 60
 <210> 24
 <211> 60
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso sintético
 40 <400> 24
 ctgttgaatt tactggtatt ttaataggtg tctcctcag gcactggitt ctagctttg 60
 <210> 25
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador directo sintético
 <400> 25
 55 cogggtggac tottgaagt actatctcga gatagtact tcaagagtcc actttttg 58
 <210> 26
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador inverso sintético

ES 2 669 450 T3

	<400> 26 aattaaaaag tggactctg aaagtactat ctogagatag tactttcaag agtccac	57
5	<210> 27 <211> 58 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador directo sintético	
	<400> 27 ccggggacca ctttcctac tftaactoga gftaaagtag ggaaagtggt ccttttg	58
15	<210> 28 <211> 58 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador inverso sintético	
	<400> 28 aattcaaaaa ggaccacttt cctacttta actogagtta aagtagggaa agtgggcc	58
25	<210> 29 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencia sintética	
	<400> 29 ggaccacuuu ccuacuuu	19
35	<210> 30 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador directo sintético	
	<400> 30 aggctgaggc gggagatcg ctt	23
45	<210> 31 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador inverso sintético	
	<400> 31 gtgtgccac gaggaataag aacc	24
55	<210> 32 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador directo sintético	

<400> 32
 aagagcccat cagttccgct tg 22

5 <210> 33
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador inverso sintético

<400> 33
 aagagcccat cagttccgct tg 22

15 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador directo sintético

<400> 34
 aaaccaagg gtaacaagga 20

25 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador inverso sintético

<400> 35
 acagtatgcc catgctcaa 20

35 <210> 36
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador directo sintético

45 <400> 36
 cttcctcca tcaacacagt cg 22

<210> 37
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador inverso sintético

55 <400> 37
 tgcttctgct gcctctgta gg 22

60 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo sintético

 <400> 38
 5 tcaaggacca cgcacatctct a 21

 <210> 39
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso sintético

 <400> 39
 15 tgaagcagaa gaaacactgg gc 22

 <210> 40
 <211> 24
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia diana de MELK sintética
 25
 <400> 40
 tgctgaaag aaactccaat taaa 24

 <210> 41
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia diana de MELK-R sintética
 35
 <400> 41
 tgctgaaagg agacacctat taaa 24

 <210> 42
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia promotora de MELK

 <400> 42
 50 accacaaaat aatttag 17

 <210> 43
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Secuencia consenso de Fox M1

 <220>
 <221> misc-feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n es C o T
 60

ES 2 669 450 T3

5
<220>
<221> misc-feature
<222> (6)..(6)
<223> n es C o T

10
<220>
<221> misc-feature
<222> (9)..(10)
<223> n es A, C, G o T

<400> 43
anaaanaann 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cantidad eficaz de un inhibidor de MELK, comprendiendo el inhibidor de MELK un ARNhp que tiene una secuencia de nucleótidos diana de MELK seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 1, SEQ. ID. NO: 2, SEQ. ID. NO: 3, SEQ. ID. NO: 4 y combinaciones de las mismas; para su uso en un sujeto en necesidad del mismo para inhibir el crecimiento o la proliferación de células de cáncer de mama; en la que las células de cáncer de mama son receptor de estrógeno (ER) negativo y receptor de progesterona (PR) negativo.
- 10 2. El inhibidor para su uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de MELK comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NOS: 5-12.
- 15 3. El inhibidor para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que las células de cáncer de mama son receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) negativo.
- 20 4. El inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además un inhibidor de FoxM1.
5. El inhibidor para su uso según la reivindicación 4, en el que el inhibidor de FoxM1 comprende un ARNip y/o tiostreptona, y opcionalmente en el que el inhibidor de FoxM1 comprende el ARNip que tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en SEQ. ID. NO: 29.
- 25 6. Un método de identificación de un sujeto que tiene cáncer que es probable que se beneficie de un tratamiento con un inhibidor de MELK o un inhibidor de FoxM1, comprendiendo el método:
- 30 determinar un estado de expresión del receptor de estrógeno y receptor de progesterona (PR) en células de cáncer de mama del sujeto; e identificar el sujeto que tiene células de cáncer de mama que son receptor de estrógeno negativo y receptor de progesterona (PR) negativo;
- 35 en el que identificar el sujeto que tiene células de cáncer de mama receptor de estrógeno negativo y receptor de progesterona (PR) negativo indica una necesidad de tratar el sujeto con un inhibidor de MELK, un inhibidor de FoxM1 o un inhibidor de MELK y un inhibidor de FoxM1 y en el que el inhibidor de MELK comprende un ARNhp que tiene una secuencia de nucleótidos diana de MELK seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 1, SEQ. ID. NO: 2, SEQ. ID. NO: 3, SEQ. ID. NO: 4 y combinaciones de las mismas.
- 40 7. El método según la reivindicación 6, en el que el inhibidor de MELK comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ. ID. NO: 5-12.
8. El método según la reivindicación 6 o 7, en el que el inhibidor de FoxM1 comprende un ARNip, opcionalmente en el que el inhibidor de FoxM1 comprende el ARNip que tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en SEQ. ID. NO: 29.
- 45 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que el inhibidor de FoxM1 es tiostreptona.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que comprende determinar el estado de expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) en las células de cáncer de mama del sujeto.

Figura 1

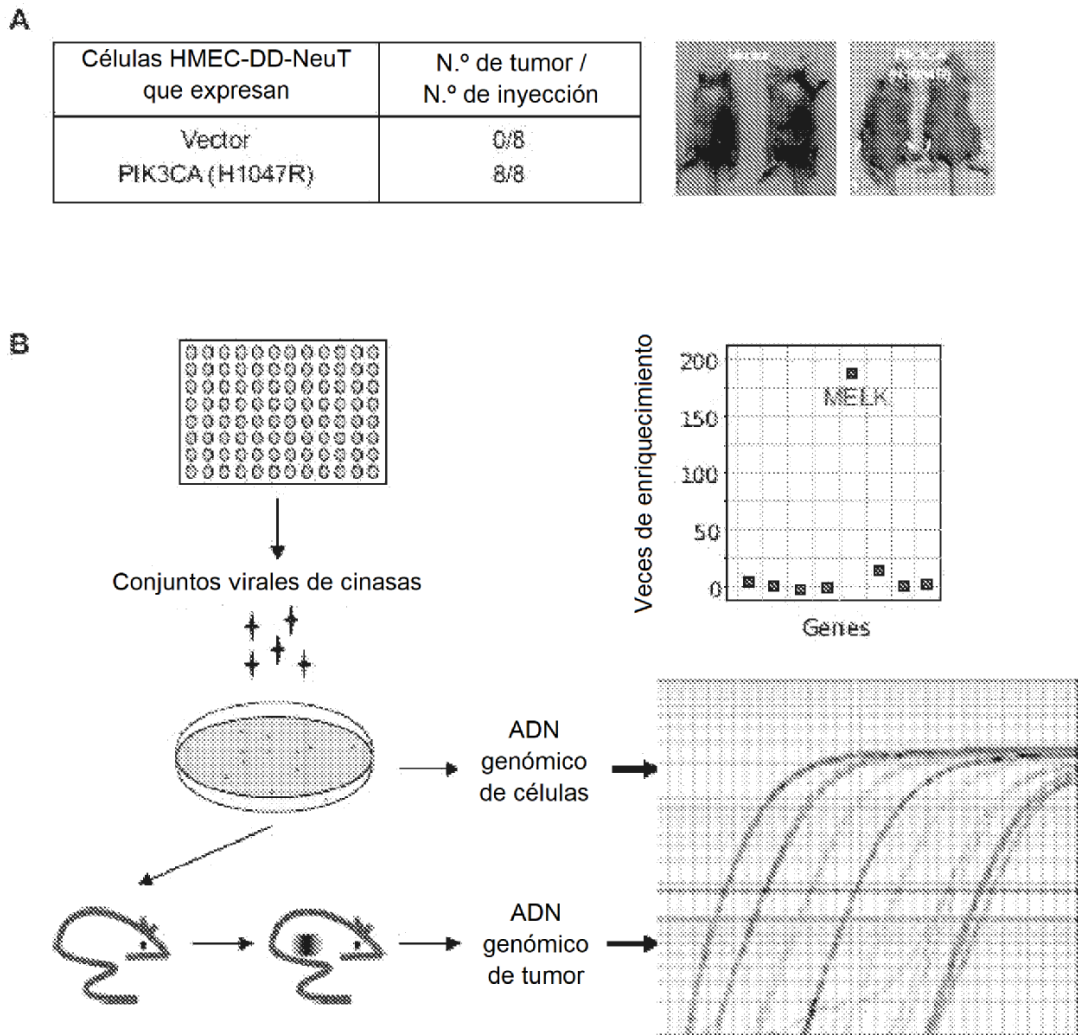
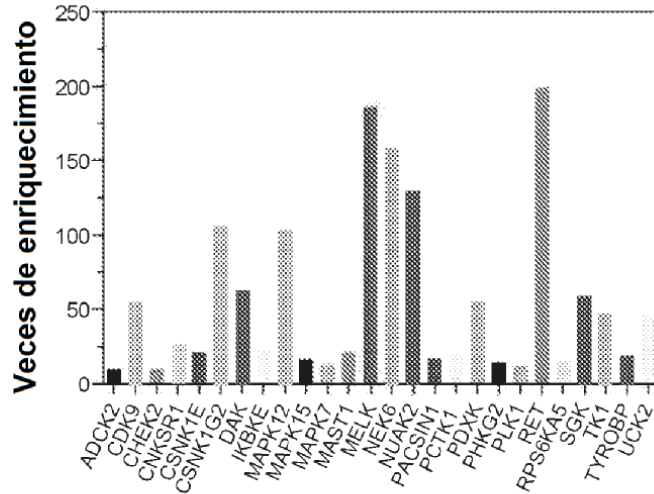


Figura 2

A



B

Gen	Descripción
ADCK2	cinasa 2 que contiene el dominio aarF
CDK9	cinasa 9 dependiente de ciclina
CHEK2	cinasa 2 del punto de control
CNKSR1	potenciador de conector de supresor de cinasa de Ras1
CSNK1E	caseína cinasa 1, épsilon
CSNK1G2	caseína cinasa 1, gamma 2
DAK	homólogo de dihidroxiacetona cinasa 2
IKBKE	inhibidor de la subunidad épsilon de la cinasa kappa 2 del factor nuclear
MAPK12	proteína cinasa 12 activada por mitógeno
MAPK15	proteína cinasa 15 activada por mitógeno
MAPK7	proteína cinasa 7 activada por mitógeno
MAST1	serina/treonina cinasa 11 asociada a microtúbulos
MELK	cinasa embrionaria materna de la cremallera de leucina
NEK6	cinasa 6 relacionada con NIMA (nunca en el gen de mitosis a)
NUAK2	familia de NUAK, cinasa de tipo SNF1, 2
PACSIN1	sustrato de proteína cinasa 2 y caseína cinasa en proteína 1 de neurona
PCTK1	cinasa de proteína serina/treonina PCTAIRE-1
PDXK	cinasa de piridoxal (piridoxina, vitamina B6)
PHKG2	fosforilasa cinasa, gamma 2
PLK1	cinasa 1 de tipo Polo
RET	proto-oncogén "reordenado durante la transfección"
RPS6KA5	proteína S6 cinasa alfa-5 ribosómica
SGK	cinasa 1 regulada por suero/glucocorticoide
TK1	timidina cinasa 1
TYROBP	proteína de unión a la proteína tirosina cinasa TYRO
UCK2	uridina-citidina cinasa 2

Figura 3

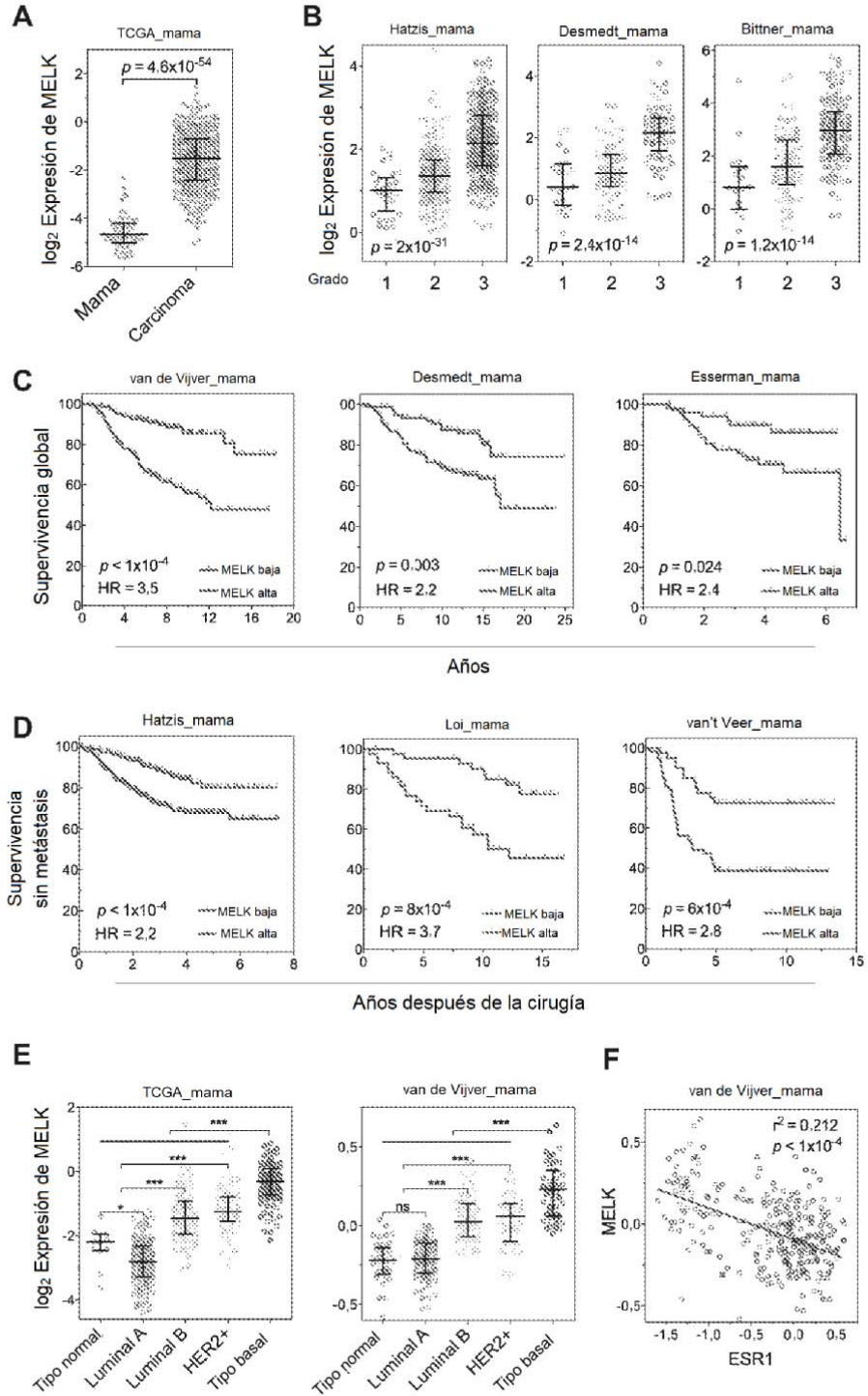


Figura 4

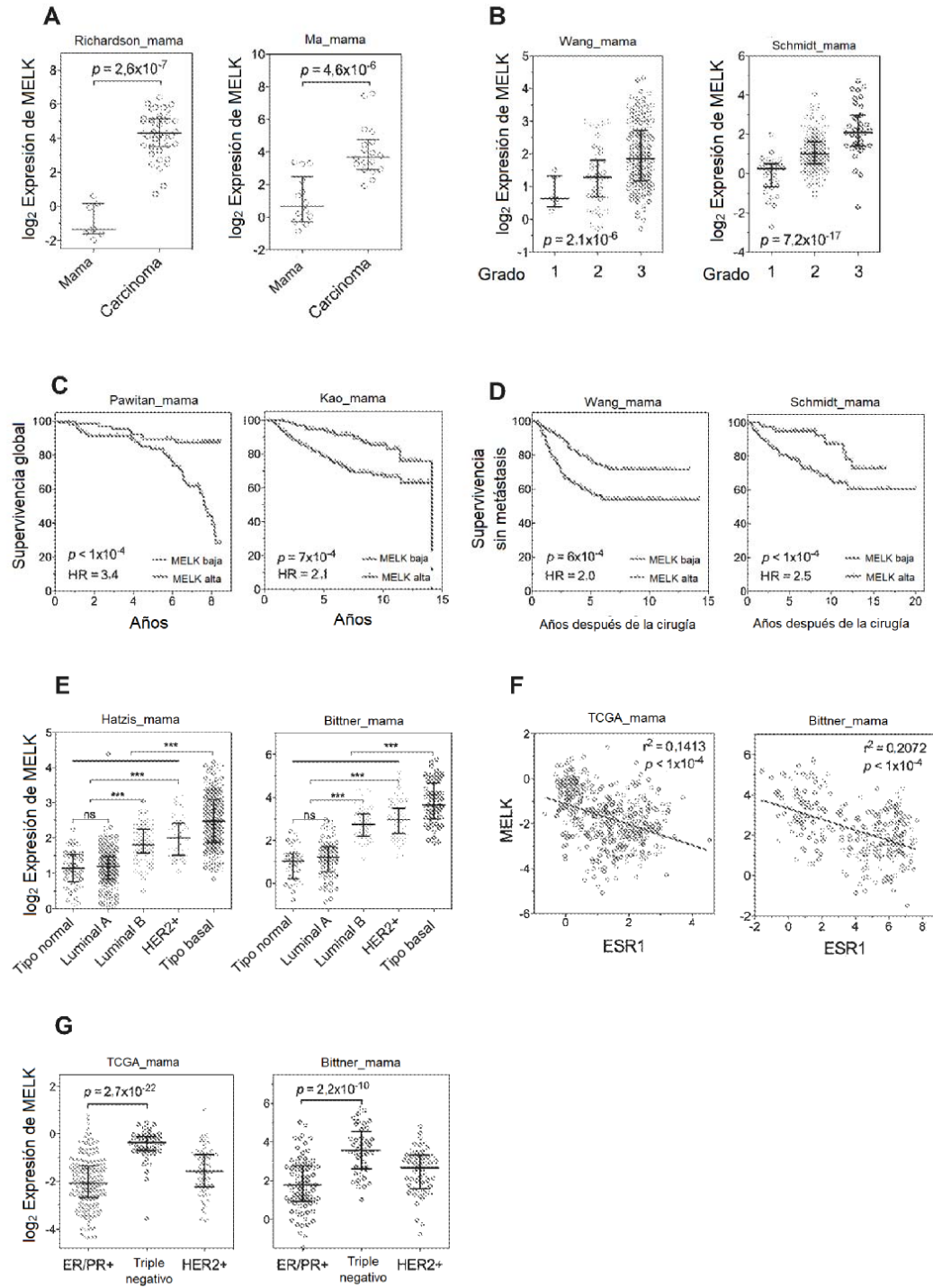


Figura 5

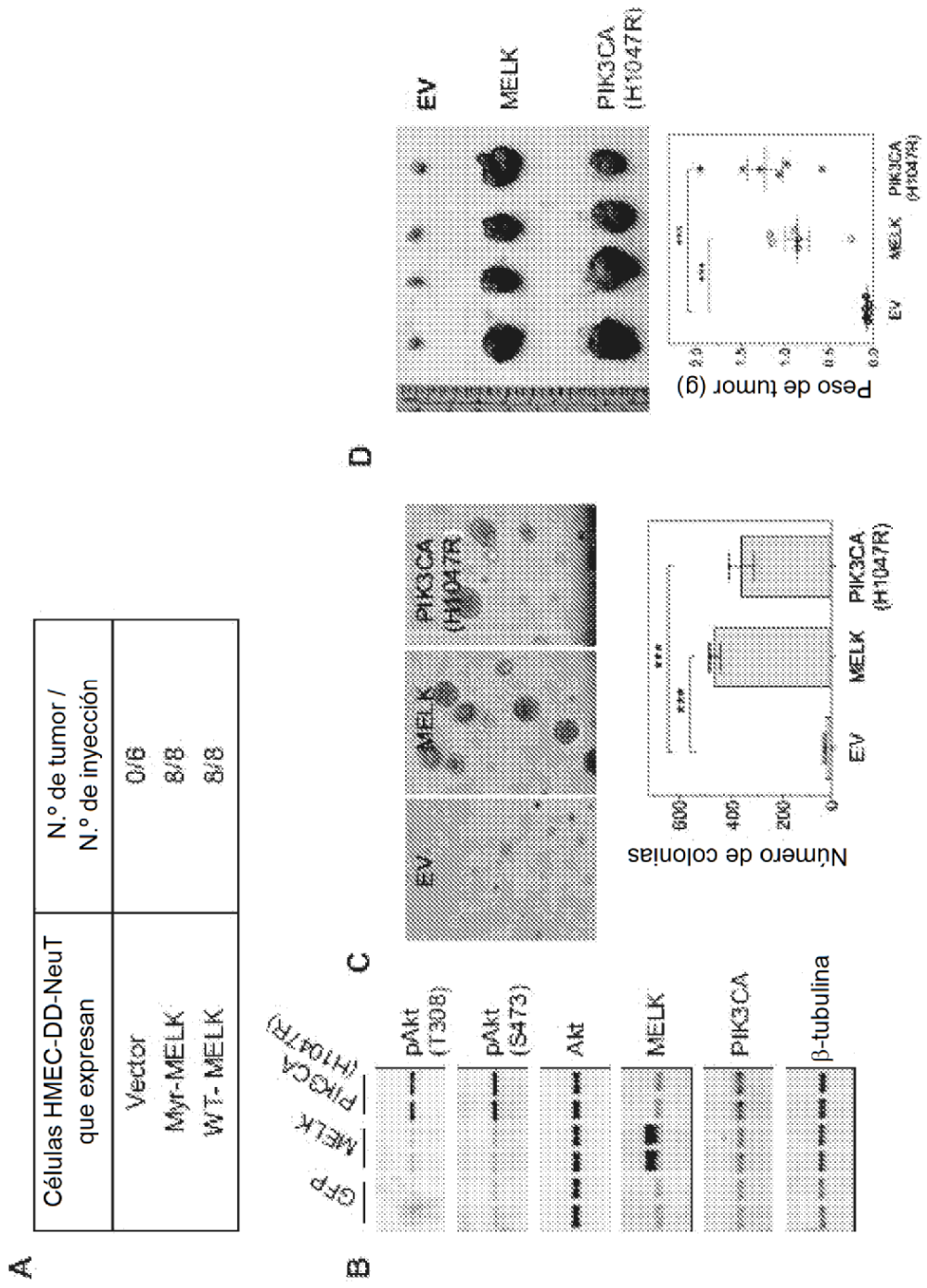


Figura 5

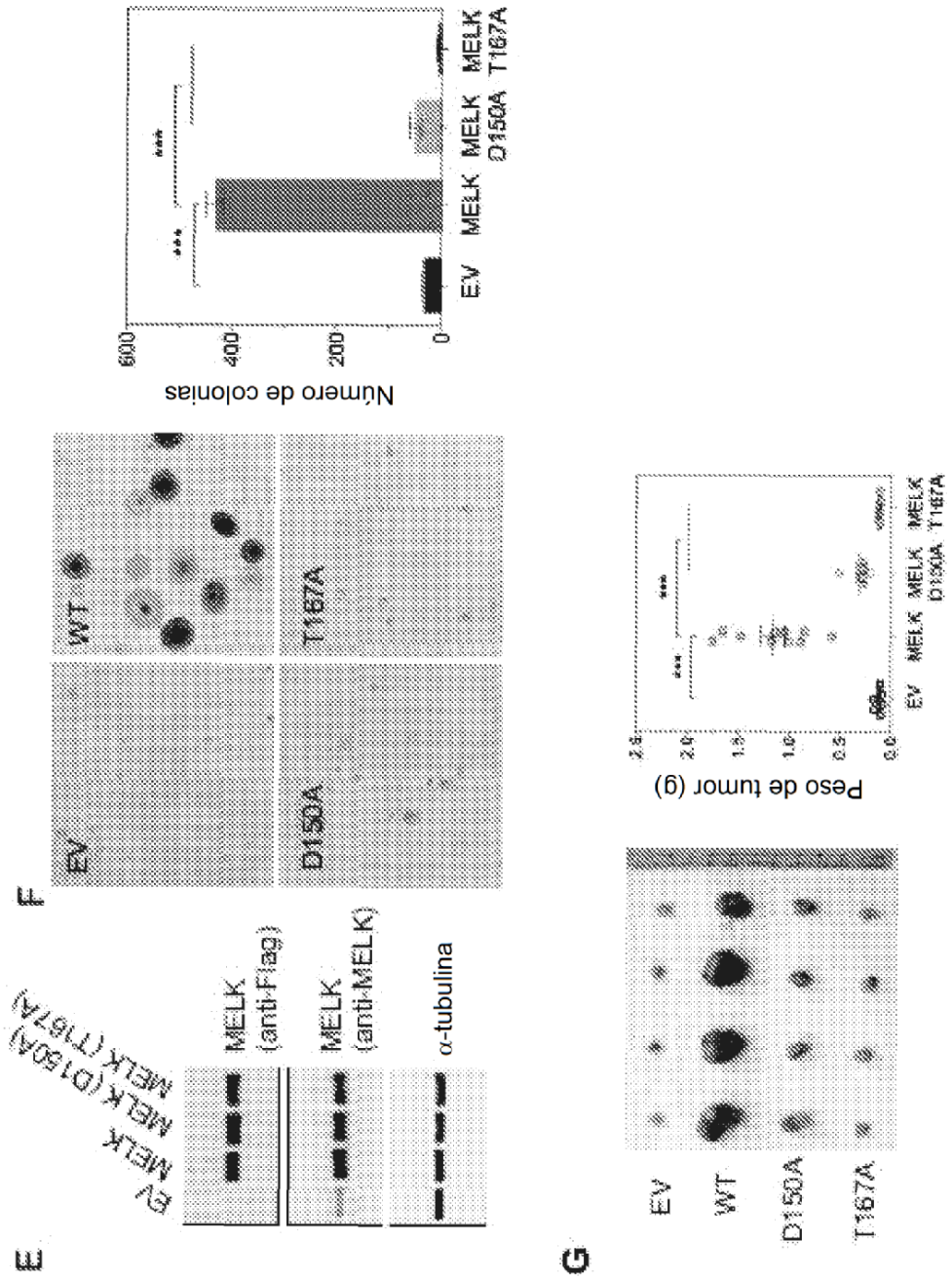
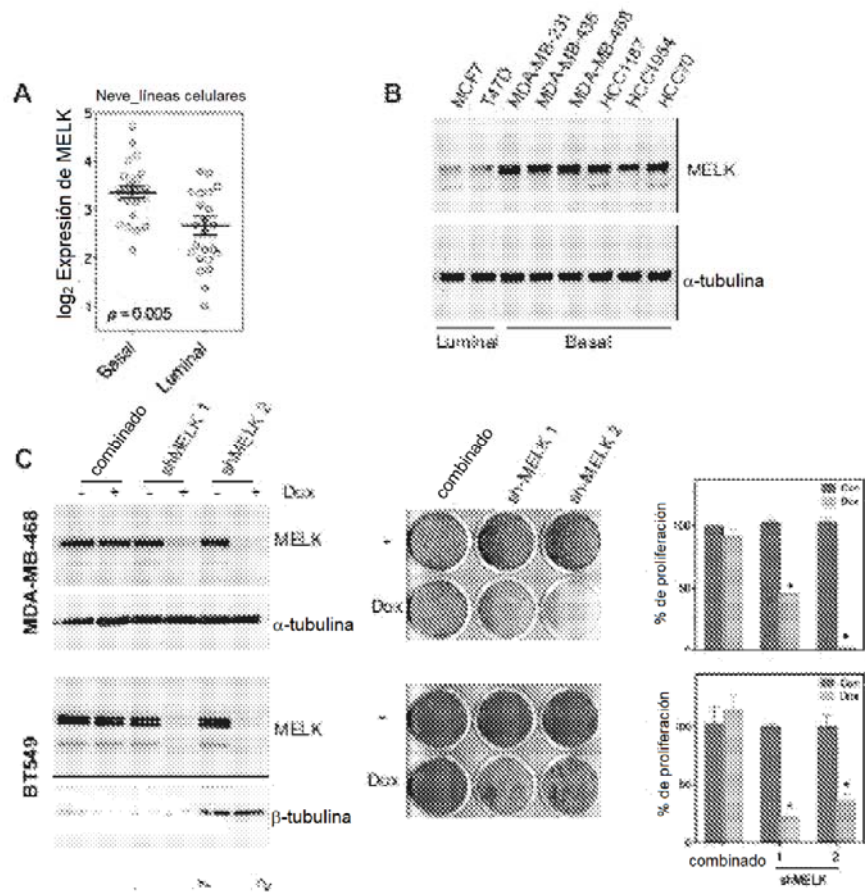


Figura 6



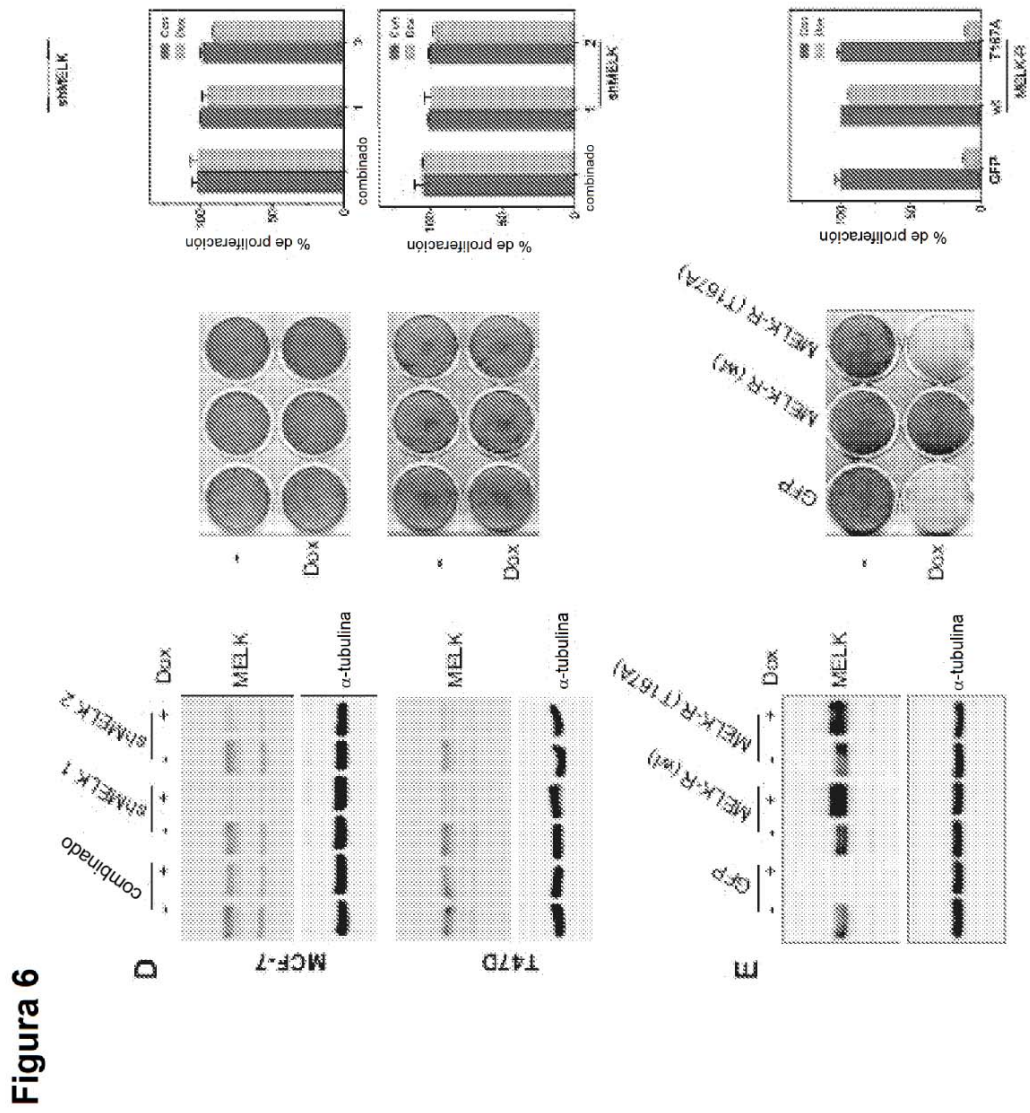
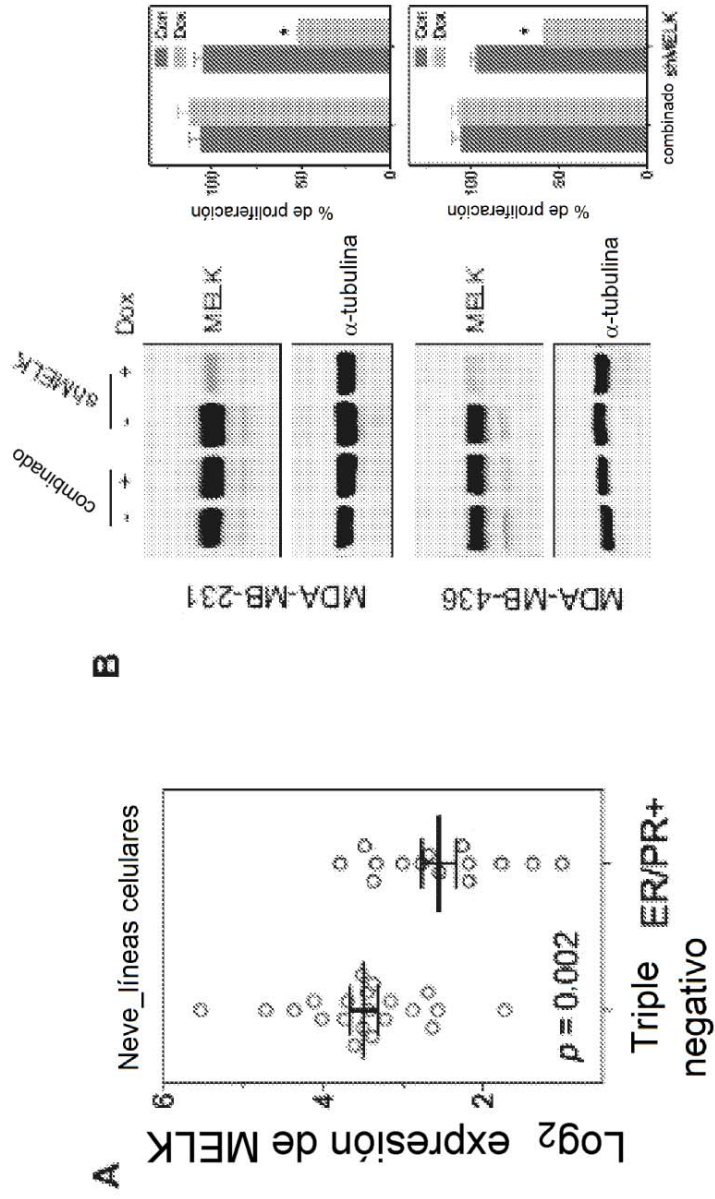
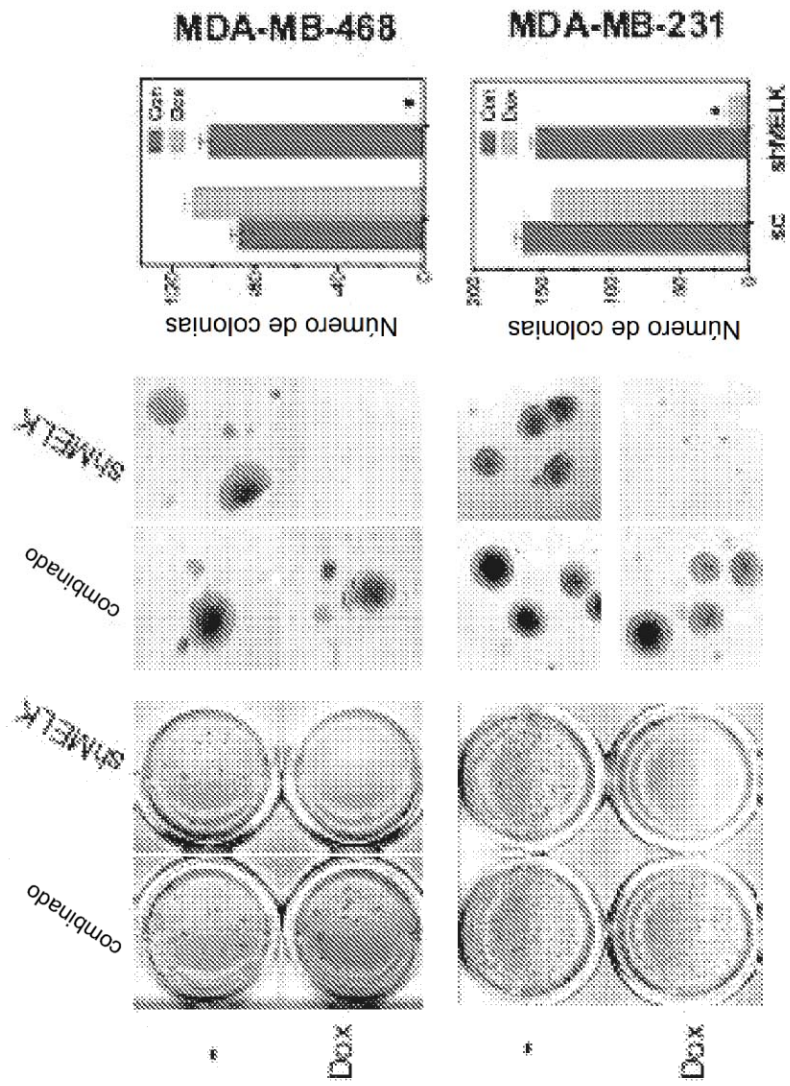


Figura 7





A

Figura 8

Figura 8

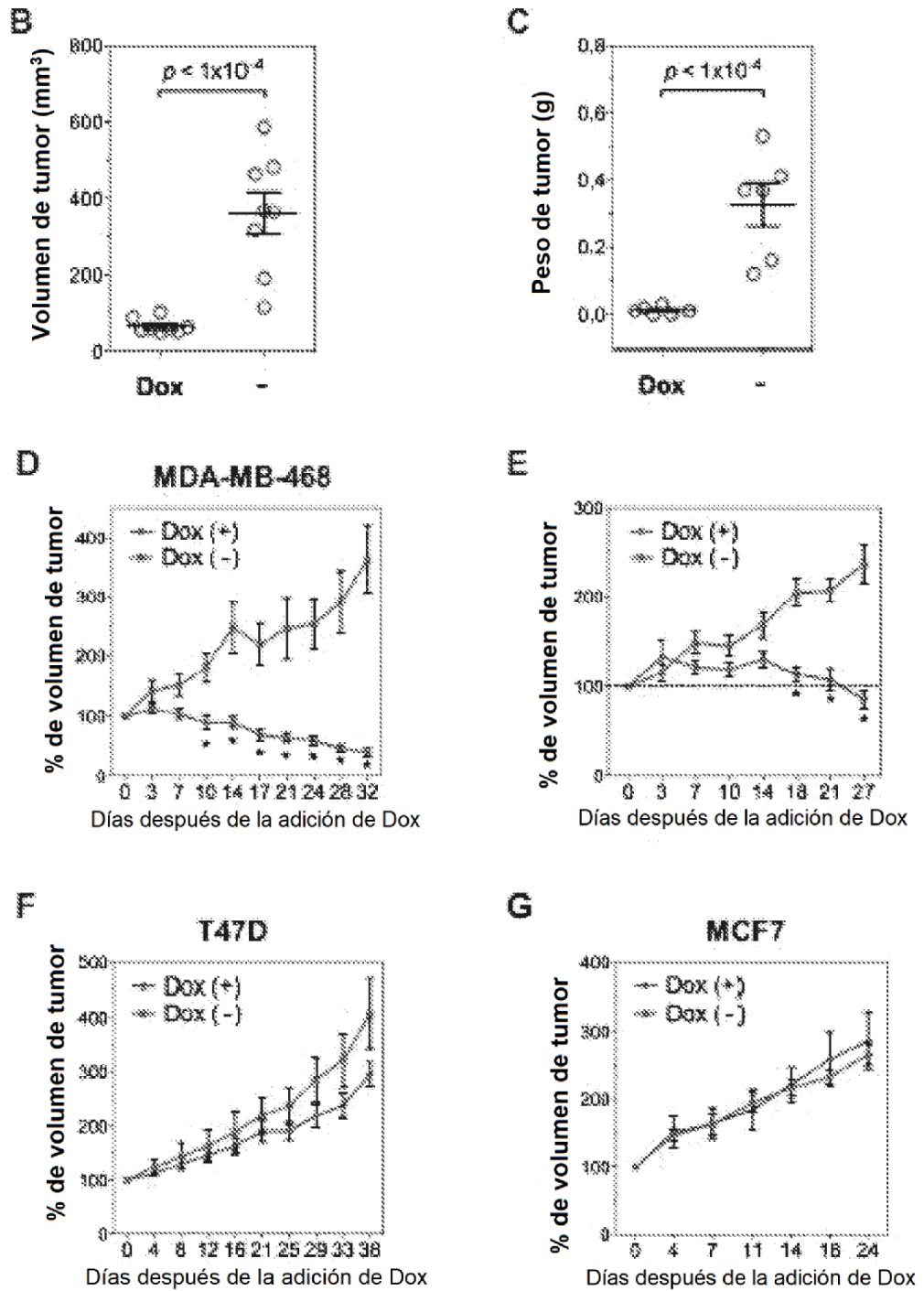


Figura 9

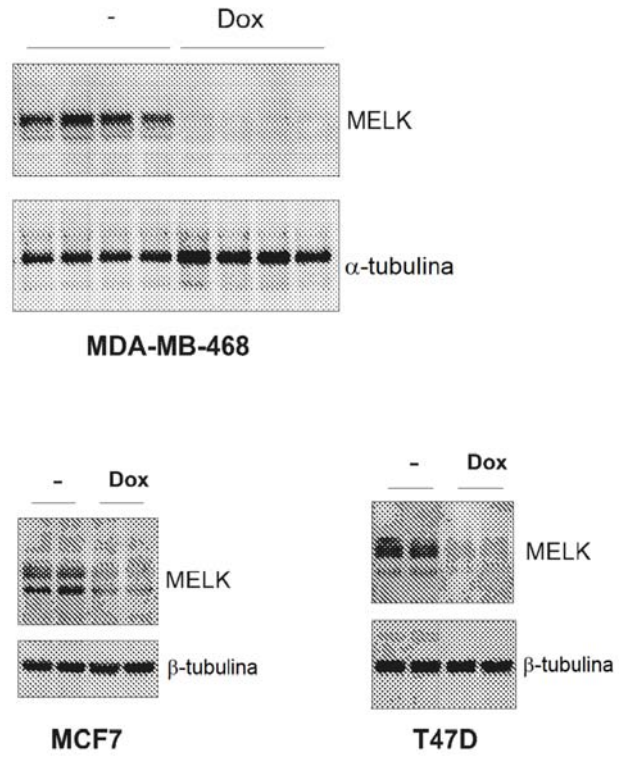


Figura 10

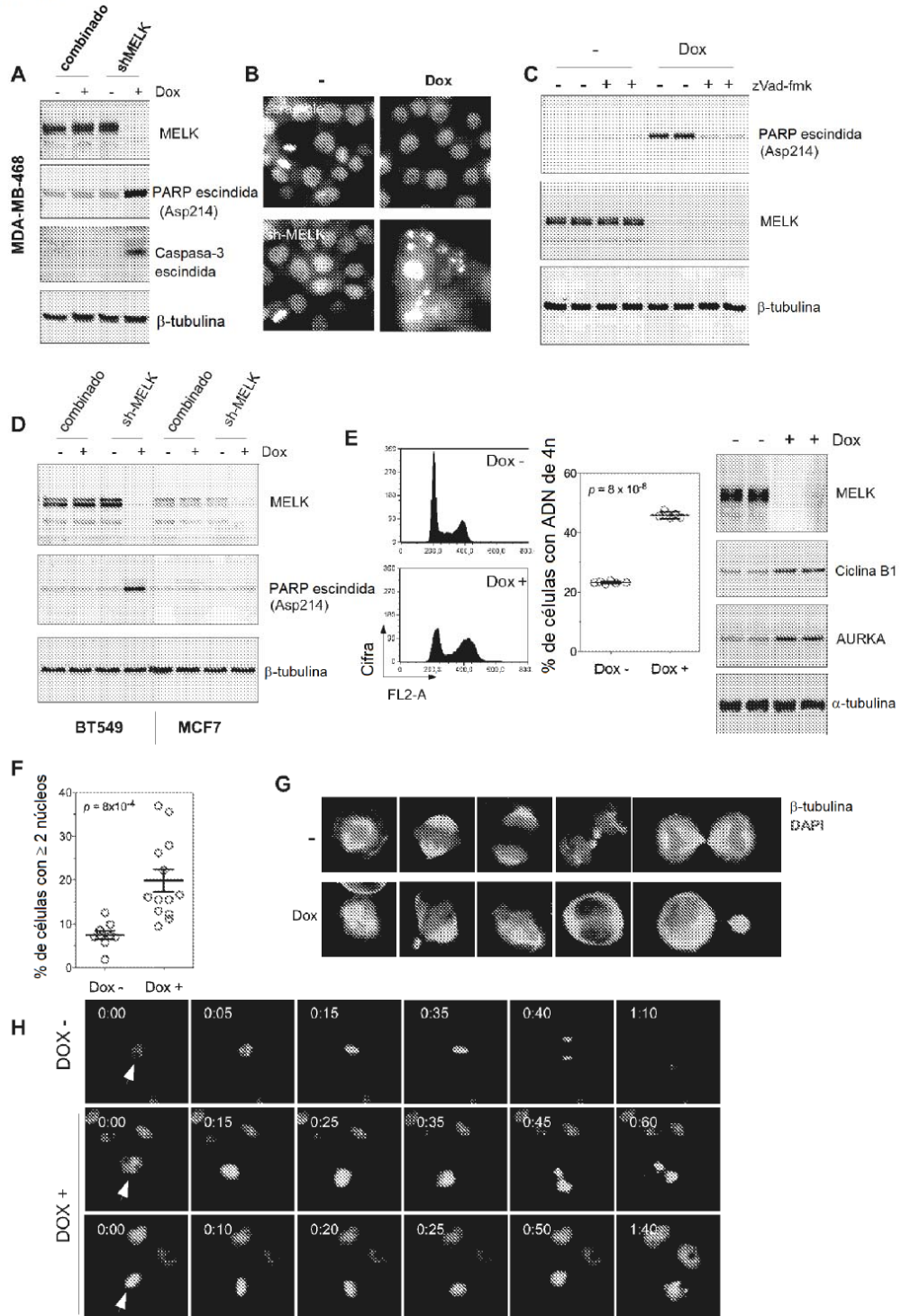


Figura 11

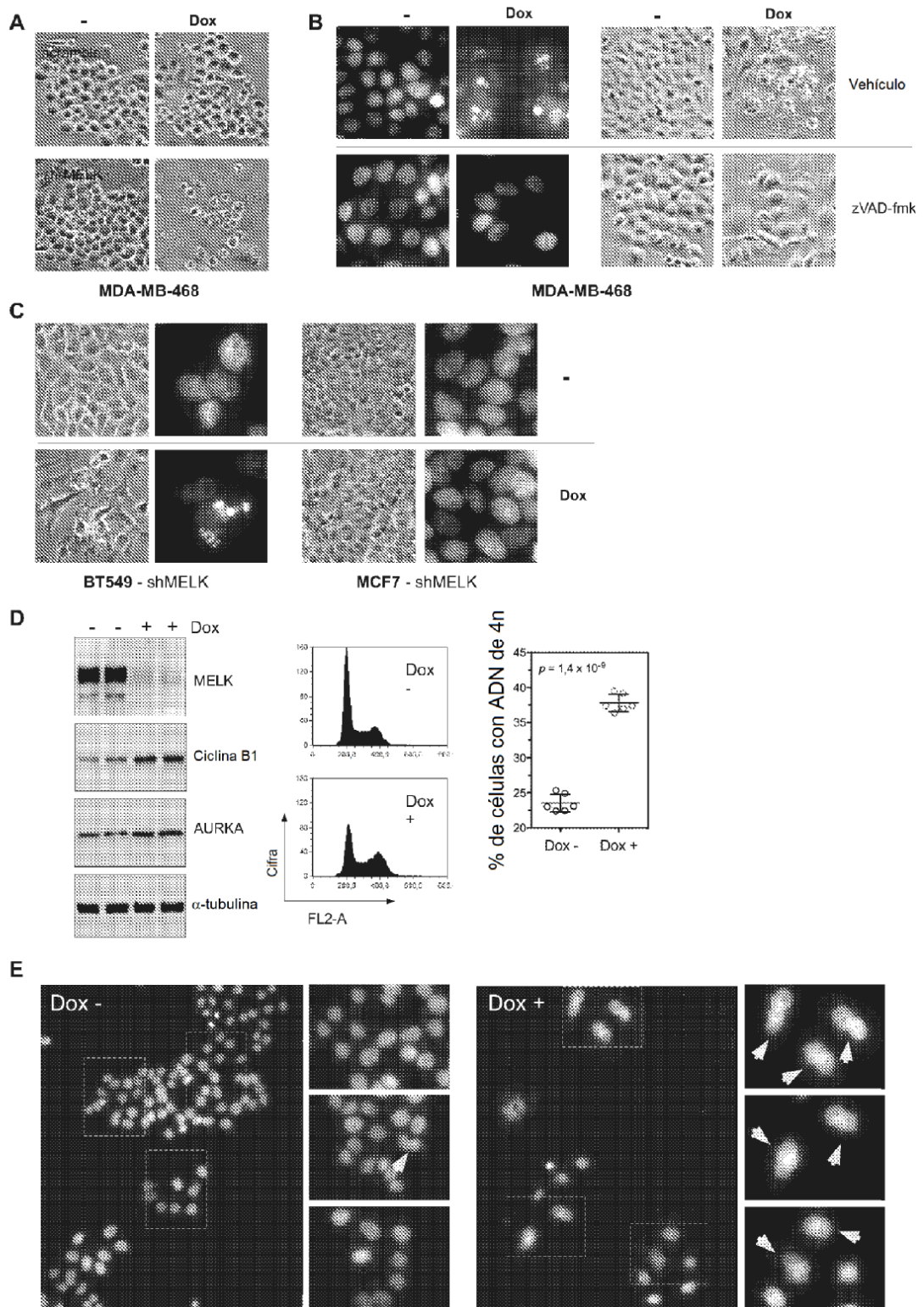


Figura 12

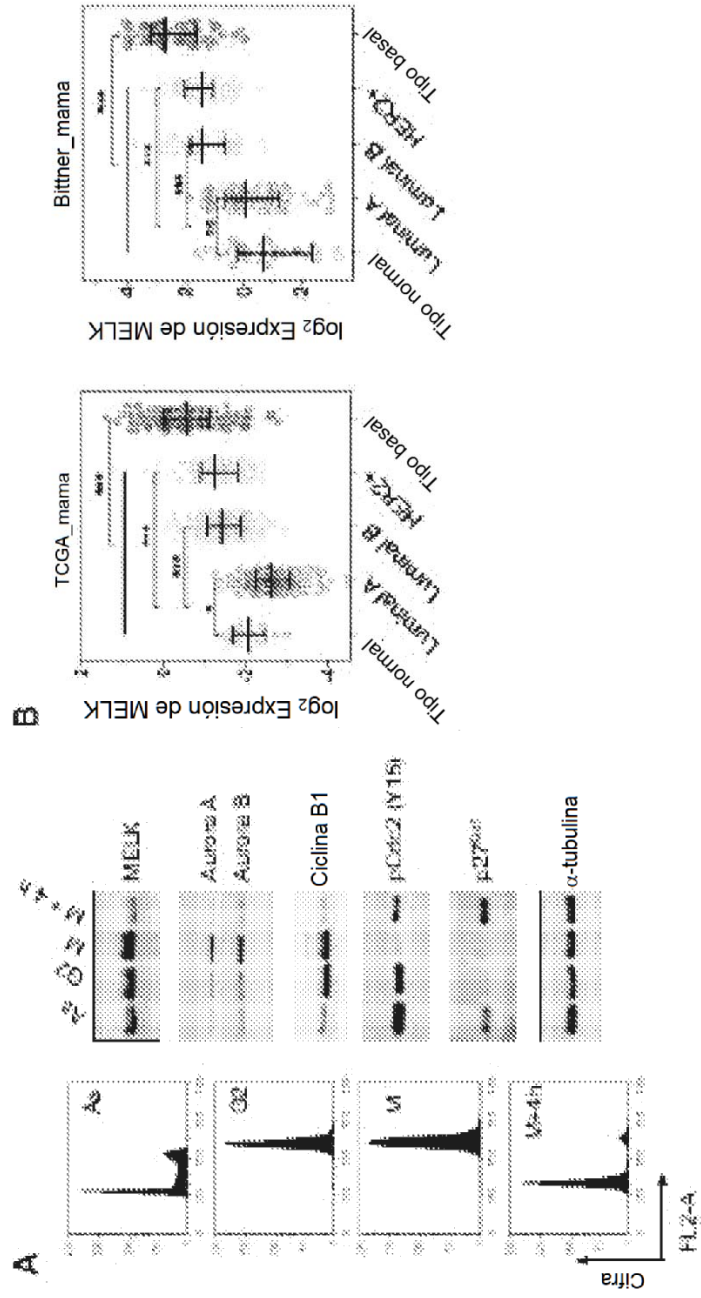


Figura 12

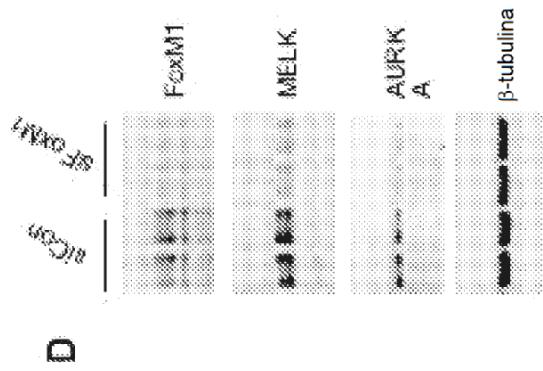
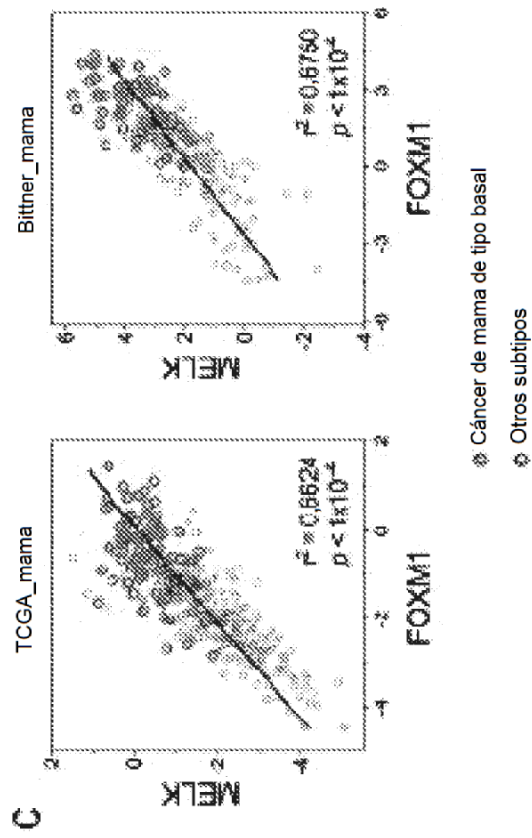


FIGURA 12

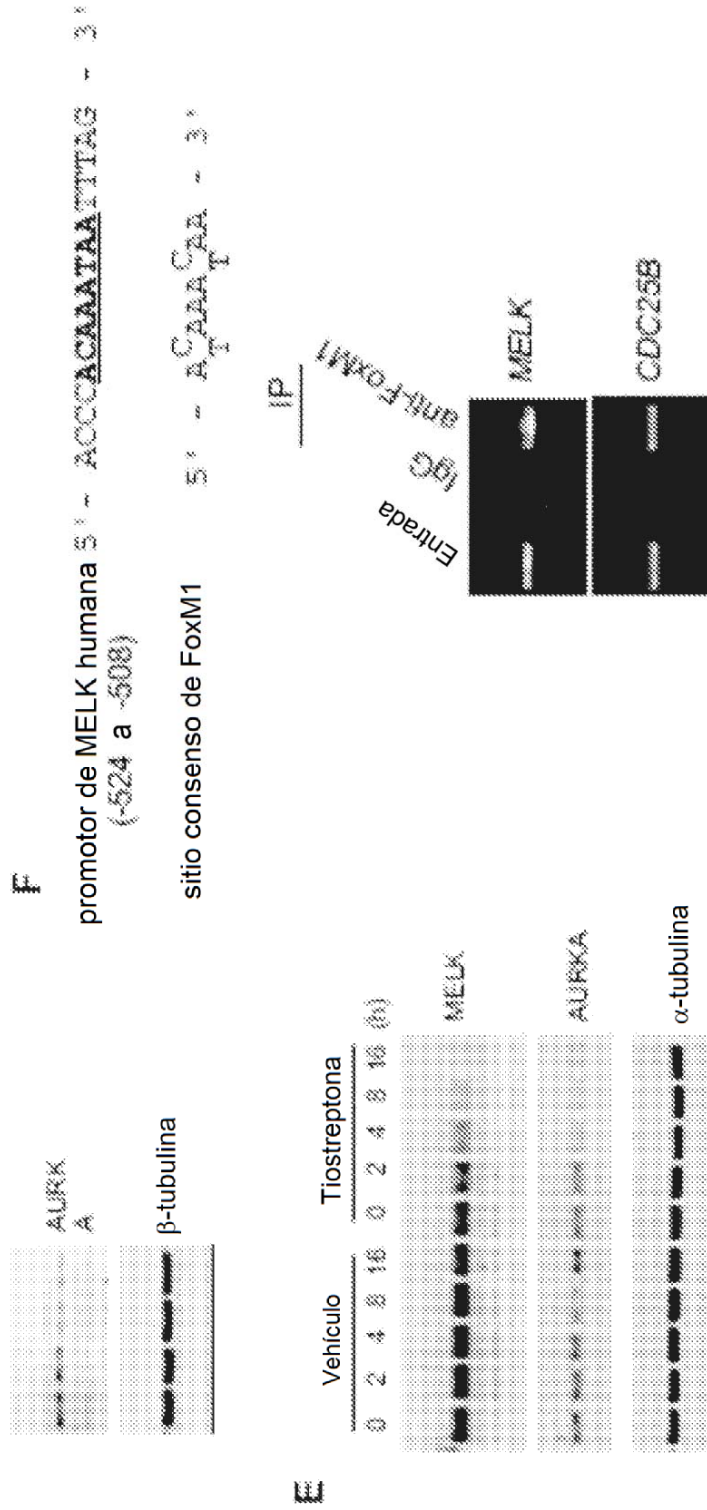
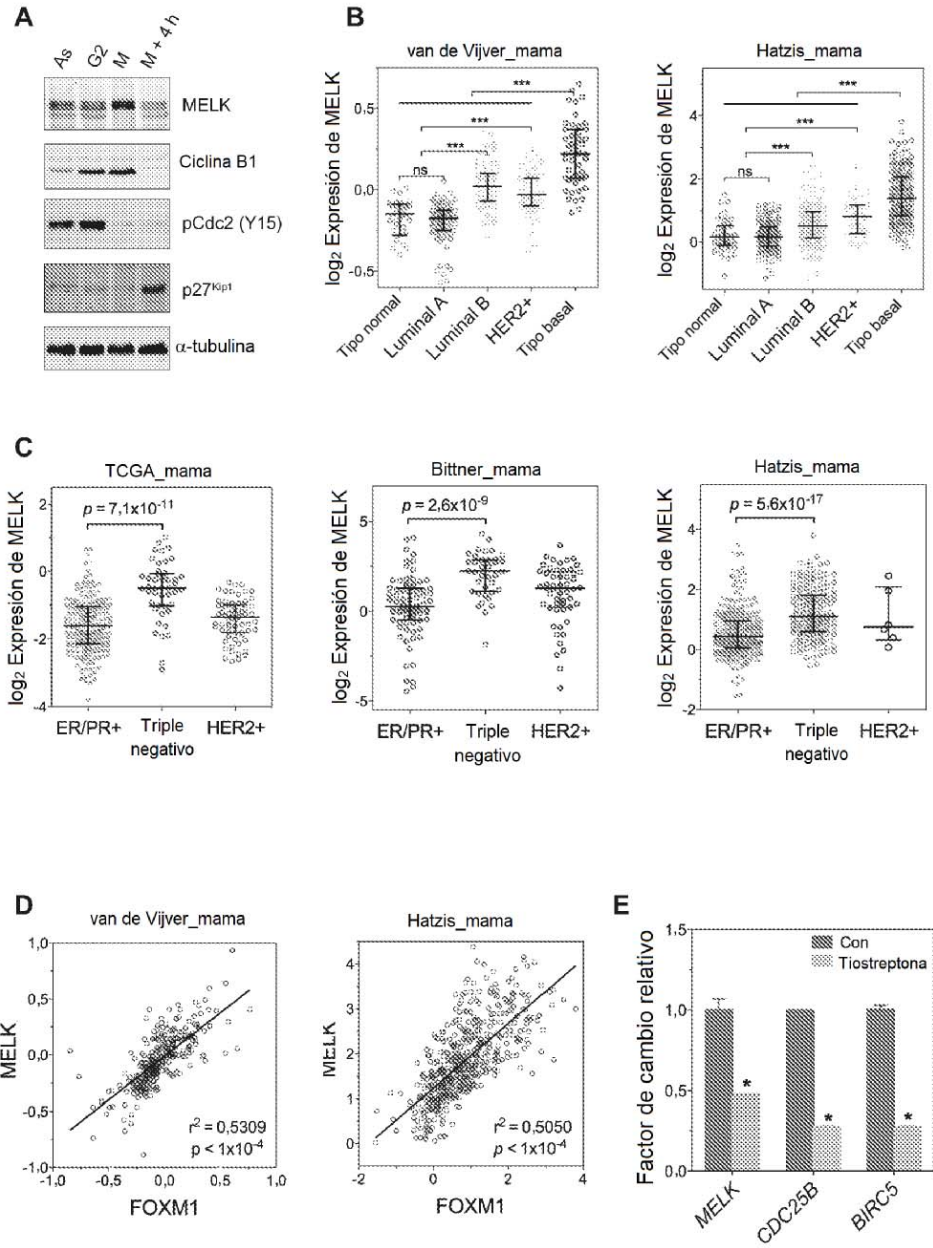


Figura 13



MELK es altamente expresada en el subtipo de cáncer de mama basal
 Datos de micromatrices de dominio público (530 muestras)

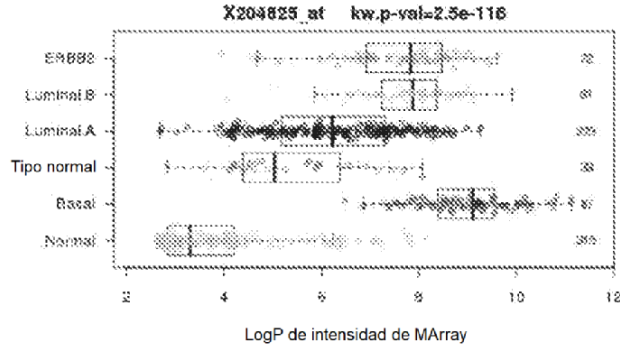
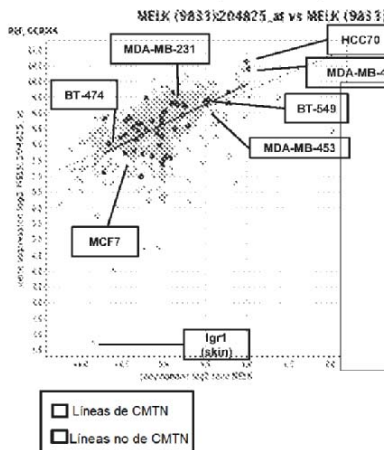


FIG. 14

Identificación de nivel de expresión alto de MELK en células de cáncer de mama ER negativo (el más alto en células de CMTN)

A. Selección de líneas celulares modelo en CCLE (OncCNA)



B. MELK es altamente expresada en células de CMTN

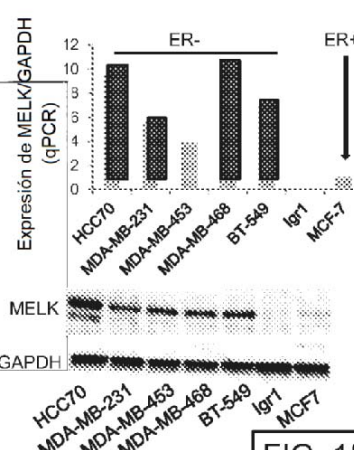
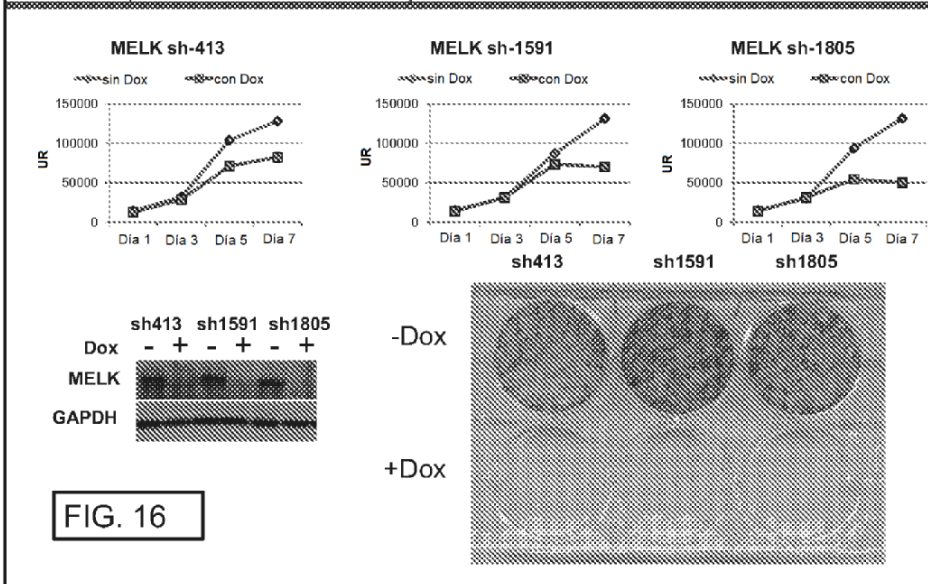
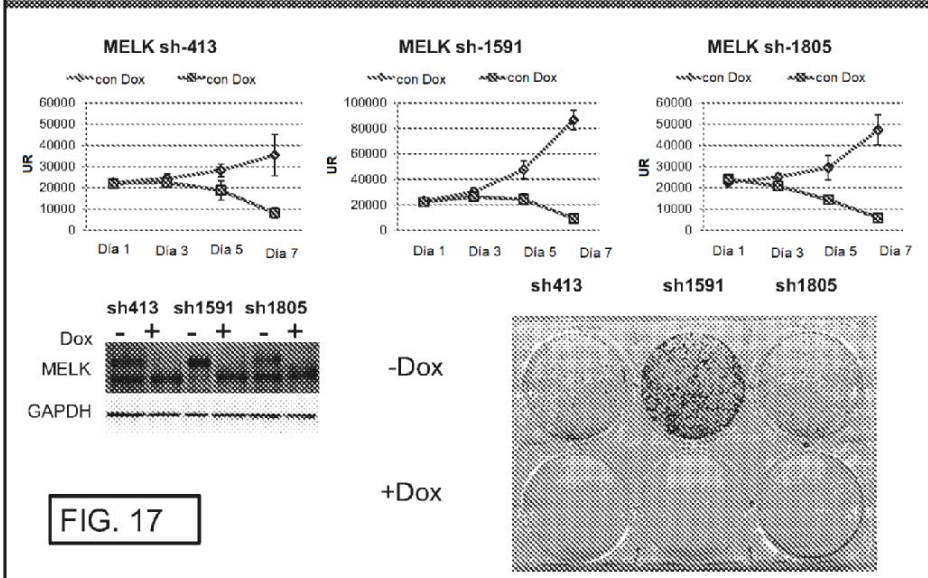


FIG. 15

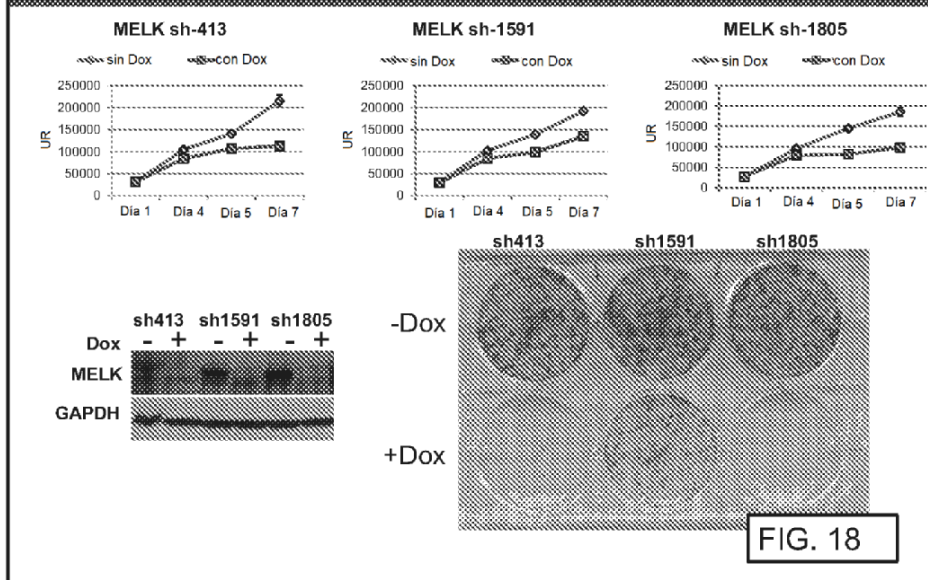
Las células de cáncer de mama de MELK alto ER- son dependientes de MELK BT549 (ER-, PR-, HER2 normal)



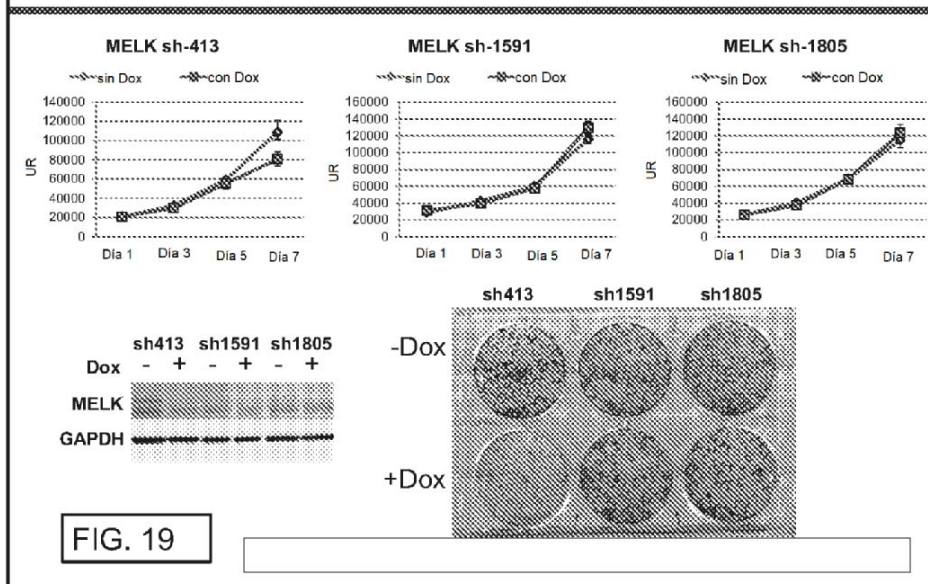
Las células de cáncer de mama de MELK alto ER- son dependientes de MELK MDA-MB-468 (ER-, PR-, HER2 normal)



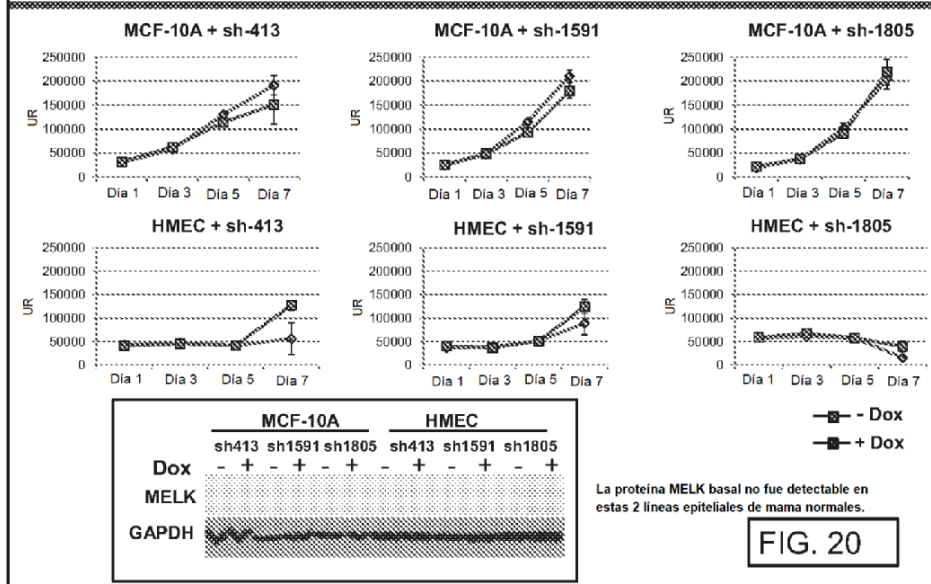
Las células de cáncer de mama de MELK alto ER- son dependientes de MELK MDA-MB-231



Las células ER+ de MELK bajo NO son dependientes de MELK MCF7 (ER+, PR+, HER2 normal)



Células epiteliales mamarias normales HMEC y células MCF10A inmortalizadas NO son dependientes de MELK



El rescate parcial sugiere que la actividad de cinasa puede ser requerida para la proliferación de líneas de CMTN dependientes de MELK

