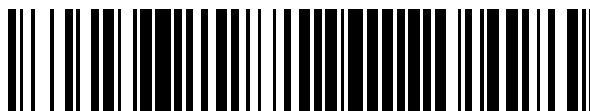


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 237**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2013 PCT/IB2013/001859**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13182912**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2013 E 13766663 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2859120**

54 Título: **Método para el diagnóstico y el pronóstico de metástasis del cáncer de pulmón**

30 Prioridad:

06.06.2012 US 201261656372 P

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

22.03.2019

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA
(IRB BARCELONA) (50.0%)
Baldri Reixac, 10-12
08028 Barcelona, ES y
INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS
AVANÇATS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GOMIS, ROGER y
PLANET, EVARIST**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 705 237 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

Método para el diagnóstico y el pronóstico de metástasis del cáncer de pulmón

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al diagnóstico o al pronóstico de metástasis, en particular metástasis ósea, en cáncer de pulmón basándose en la determinación de si el gen c-MAF está amplificado en una muestra de tumor primario. Asimismo, la invención también se refiere a un método para el diagnóstico o el pronóstico de metástasis en
10 cáncer de pulmón, en particular metástasis ósea, así como a un método para diseñar una terapia personalizada en un sujeto con cáncer de pulmón, que comprende determinar el nivel de expresión del gen c-MAF.

Antecedentes de la técnica

15 La metástasis, un proceso complejo causado por complicadas interacciones entre las células tumorales y los tejidos normales circundantes en diferentes órganos vitales, representa el 90 por ciento de todas las muertes por cáncer en pacientes con tumores sólidos. Los mecanismos moleculares y celulares que llevan a los tumores primarios a formar metástasis deben entenderse para poder abordar mejor este importante problema potencialmente letal. La
20 identificación de genes y mecanismos de metástasis es esencial para comprender la biología básica de esta afección mortal y sus implicaciones para la práctica clínica. El trabajo anterior proporcionó un sentido de la complejidad del proceso de metástasis, pero no pudo explicar cómo y por qué se produce la metástasis, qué mecanismos hacen que la metástasis sea un proceso específico del tejido, qué acontecimientos permiten que las metástasis latentes se vuelvan activas y mortales muchos años después de la extirpación de un tumor primario, y qué genes mediadores de metástasis constituirían finalmente marcadores de diagnóstico y dianas terapéuticas
25 valiosos.

Metástasis específica del hueso desde el pulmón

30 El cáncer de pulmón es una enfermedad caracterizada por el crecimiento celular descontrolado en los tejidos del pulmón. Si no se trata, este crecimiento puede diseminarse más allá del pulmón en un proceso llamado metástasis al tejido cercano y, finalmente, a otras partes del cuerpo. La mayoría de los cánceres que comienzan en el pulmón, conocidos como cánceres de pulmón primarios, son carcinomas que se derivan de las células epiteliales. A nivel mundial, el cáncer de pulmón es la causa más común de muerte relacionada con el cáncer en hombres y mujeres, y es responsable de 1,3 millones de muertes anuales, desde 2004. Los síntomas más comunes son dificultad para respirar, tos (incluso tos con sangre) y pérdida de peso.
35

Los cánceres de pulmón consisten en cuatro tipos principales de cáncer de pulmón y múltiples formas menores o raras. Por razones clínico-patológicas, a menudo se dividen en las categorías generales de cáncer de pulmón microcítico (SCLC), también llamado cáncer microcelular y cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). El NSCLC se divide en tres tipos principales, carcinoma de células escamosas (SCC), adenocarcinoma y carcinomas
40 macrocíticos. Debido a que los carcinomas macrocíticos pueden representar formas poco diferenciadas o indiferenciadas de los otros tipos de cáncer, es una entidad vagamente definida y los criterios para su diagnóstico varían ampliamente. La causa más común de cáncer de pulmón es la exposición prolongada al humo del tabaco. Los no fumadores representan el 15 % de los casos de cáncer de pulmón, y estos casos a menudo se atribuyen a una combinación de factores genéticos, gas radón, amianto y contaminación del aire, incluyendo el humo inhalado como fumador pasivo.
45

Al igual que muchos otros cánceres, el cáncer de pulmón se inicia mediante la activación de oncogenes o la inactivación de los genes supresores de tumores. Los oncogenes son genes que se cree que hacen que las personas sean más susceptibles al cáncer. Se cree que los protooncogenes se convierten en oncogenes cuando se exponen a carcinógenos particulares. Las mutaciones en el protooncogén K-ras son responsables del 10-30 % de los adenocarcinomas de pulmón. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) regula la proliferación celular, la apoptosis, la angiogénesis y la invasión tumoral. Las mutaciones y la amplificación de EGFR son comunes en el cáncer de pulmón no microcítico y proporcionan la base para el tratamiento con inhibidores de EGFR. Her2/neu resulta afectado con menos frecuencia. El daño cromosómico puede causar la pérdida de heterocigosidad. Esto puede causar la inactivación de los genes supresores de tumores. El daño a los cromosomas 3p, 5q, 13q y 17p es particularmente común en el carcinoma de pulmón microcítico. El gen supresor de tumores p53, situado en el cromosoma 17p, resulta afectado en el 60-75 % de los casos. Otros genes que a menudo se mutan o amplifican son c-MET, NKX2-1, LKB1, PIK3CA y BRAF.
50
55
60

Varios polimorfismos genéticos están asociados con el cáncer de pulmón. Estos incluyen polimorfismos en los genes que codifican interleucina-1, citocromo P450, promotores de la apoptosis, tales como caspasa-8, y moléculas de reparación del ADN, tales como XRCC1. Las personas con estos polimorfismos son más propensas a desarrollar cáncer de pulmón después de la exposición a carcinógenos.
65

Clasificación

- 5 Los cánceres de pulmón se clasifican de acuerdo con el tipo histológico. Esta clasificación tiene implicaciones importantes para el tratamiento clínico y el pronóstico de la enfermedad. La gran mayoría de los cánceres de pulmón son carcinomas—tumores malignos que se originan a partir de las células epiteliales. Los dos tipos histológicos más comunes de carcinoma de pulmón, categorizados por el tamaño y el aspecto de las células malignas observadas por un histopatólogo en un microscopio, son los carcinomas de pulmón microcítico y no microcítico. El tipo microcítico es el más prevalente con mucho.
- 10 Se puede determinar que el cáncer que descubierto fuera del pulmón ha surgido dentro del pulmón, ya que los cánceres de pulmón que metastatizan, es decir, se diseminan, a menudo conservan un perfil de marcadores celulares que permite a un patólogo decir, con bastante certeza, que el tumor surgió del pulmón, es decir, es un cáncer de pulmón primario. Los cánceres de pulmón primarios de la histología del adenocarcinoma normalmente presentan inmunotinción nuclear con TTF-1.
- 15 **Carcinoma de pulmón no microcítico**
- Los carcinomas de pulmón no microcíticos (NSCLC) se agrupan porque su pronóstico y tratamiento son similares. Hay tres subtipos principales: carcinoma de pulmón de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de pulmón macrocítico.
- 20 Representando el 25 % de los cánceres de pulmón, el carcinoma de pulmón de células escamosas habitualmente comienza cerca de un bronquio central. Una cavidad hueca y una necrosis asociada se encuentran comúnmente en el centro del tumor. Los cánceres de pulmón de células escamosas bien diferenciados a menudo crecen más lentamente que otros tipos de cáncer.
- 25 El adenocarcinoma es responsable del 40 % de los cánceres de pulmón no microcíticos. Habitualmente se origina en el tejido pulmonar periférico. La mayoría de los casos de adenocarcinoma están asociados con el tabaquismo; sin embargo, entre las personas que nunca han fumado ("nunca fumaron"), el adenocarcinoma es la forma más común de cáncer de pulmón. Un subtipo de adenocarcinoma, el carcinoma bronquioloalveolar, es más común en mujeres que nunca fumaron y puede presentar diferentes respuestas al tratamiento.
- 30 **Carcinoma de pulmón microcítico**
- 35 El carcinoma de pulmón microcítico (SCLC) es menos común. Anteriormente se denominaba carcinoma "microcelular". La mayoría de los casos surgen en las vías respiratorias más grandes (bronquios primarios y secundarios) y crecen rápidamente, haciéndose bastante grandes. Las células pequeñas contienen gránulos neurosecretorios densos (vesículas que contienen hormonas neuroendocrinas), que le dan a este tumor una asociación de síndrome endocrino/paraneoplásico. Aunque inicialmente es más sensible a la quimioterapia y la radiación, a menudo es metastásico en el momento de la presentación y, en última instancia, tiene un peor pronóstico. Los cánceres de pulmón microcíticos durante mucho tiempo han sido estadificados de forma dicotómica en enfermedad en estadio limitado y extenso. Este tipo de cáncer de pulmón está fuertemente asociado con el tabaquismo.
- 40 **Pronóstico**
- 45 Los factores de pronóstico en el cáncer de pulmón no microcítico incluyen la presencia o ausencia de síntomas pulmonares, el tamaño del tumor, el tipo de células (histología), el grado de diseminación (estadio) y las metástasis a múltiples ganglios linfáticos, y la invasión vascular. Para los pacientes con enfermedad inoperable, el pronóstico se ve afectado de forma adversa por un mal estado general y una pérdida de peso de más del 10 %. Los factores de pronóstico en el cáncer de pulmón microcítico incluyen el estado general, el género, el estadio de la enfermedad y la afectación del sistema nervioso central o del hígado en el momento del diagnóstico.
- 50 Para el carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC), el pronóstico generalmente es malo. Tras la resección quirúrgica completa de la enfermedad en estadio IA, la supervivencia a los cinco años es del 67 %. Con la enfermedad en el estadio IB, la supervivencia a los cinco años es del 57 %. La tasa de supervivencia a los cinco años de los pacientes con NSCLC en estadio IV es aproximadamente del 1 %.
- 55 Para el carcinoma de pulmón microcítico, el pronóstico también es generalmente malo. La supervivencia global a los cinco años para los pacientes con SCLC es de aproximadamente el 5 %. Los pacientes con SCLC en estadio extenso tienen una tasa de supervivencia promedio a los cinco años inferior al 1 %. El tiempo medio de supervivencia para la enfermedad en estadio limitado es de 20 meses, con una tasa de supervivencia a los cinco años del 20 %.
- 60 De acuerdo con los datos proporcionados por el Instituto Nacional del Cáncer, la mediana de edad en el momento del diagnóstico de cáncer de pulmón en los Estados Unidos es de 70 años, y la mediana de edad en el momento de
- 65

la muerte es de 72 años. En Estados Unidos, las personas con seguro médico tienen más probabilidades de tener un mejor desenlace.

Metástasis

5 Los cánceres de pulmón primarios, a su vez, suelen metastatizar a las glándulas suprarrenales, el hígado, el cerebro y los huesos.

10 La metástasis esquelética se produce en el cáncer de pulmón en estadio avanzado y confiere un alto nivel de morbilidad. En el primer diagnóstico de enfermedad con metástasis ósea, la intervención terapéutica generalmente implicará quimioterapia sistémica, radioterapia y bisfosfonatos, que en su mayoría son opciones paliativas con la intención de reducir el dolor.

15 En el hueso esquelético sano, se consigue un equilibrio equitativo entre la formación de la nueva matriz ósea y la resorción de la matriz ósea antigua mediante la actividad coordinada de los osteoclastos que degradan el hueso y los osteoblastos formadores de hueso. Durante la enfermedad con metástasis ósea, el equilibrio normal de la resorción y formación ósea se ve alterado por las interacciones homotípicas y heterotípicas de célula a célula que se producen entre células tumorales invasoras, osteoblastos y osteoclastos. La mayoría de los pacientes con tumores óseos secundarios, incluyendo los relacionados con el cáncer de pulmón, presentan lesiones osteolíticas. Por lo tanto, la mayoría de las estrategias de tratamiento en uso actual o en evaluación en enfermedad con metástasis ósea se han diseñado para proteger a la matriz ósea del aumento de la actividad degradante ósea de los osteoclastos. Las lesiones osteolíticas del pulmón con metástasis ósea son una característica común con las de mama, en oposición al cáncer de próstata. En este último, una complicación adicional presente en el cáncer de próstata resistente a la castración y en la enfermedad con metástasis ósea son las lesiones osteoescleróticas, también conocidas como lesiones formadoras de hueso u las lesiones osteoblásticas, o una combinación de ambas, lesiones osteolíticas y osteoescleróticas, también conocidas como lesiones mixtas. Las lesiones osteoescleróticas se caracterizan por depósitos óseos con múltiples capas de fibrillas de colágeno de tipo I mal organizadas que tienen un aspecto tejido y una resistencia mecánica reducida. Basándose en las características fenotípicas comunes de la metástasis ósea del cáncer de pulmón y de mama, es probable que el proceso enfatice mecanismos moleculares similares.

20 Las células de cáncer de pulmón conservan, entre cada subtipo, los cambios transcripcionales inducidos por la aberración del genoma con alta fidelidad. Los genes dominantes resultantes revelarán acontecimientos moleculares que predicen el desenlace metastático a pesar de la existencia de una heterogeneidad genómica, transcripcional, traduccional y biológica sustancial en el sistema en general. Sin embargo, se desconoce si el historial de desarrollo de un cáncer daría como resultado mediadores diferentes o comunes de la metástasis específica de sitio.

25 Los factores predisponentes relacionados con la célula de origen pueden generar diferentes barreras limitadoras de la velocidad durante la progresión metastásica. La presente patente tiene como objetivo establecer el escenario para un nuevo factor pronóstico detallado para predecir la metástasis al hueso y su valor potencial como una diana terapéutica.

30 El hecho de que la mayoría de los pacientes con cáncer de tumor sólido mueren después de la metástasis significa que es crucial entender los mecanismos moleculares y celulares que permiten que un tumor metastatice. Publicaciones recientes han demostrado cómo la metástasis es causada por medio de mecanismos complejos pero poco conocidos y también cómo los diferentes tipos de células metastásicas presentan un tropismo hacia órganos específicos. Estas células metastásicas específicas de tejido tienen una serie de funciones adquiridas que les permiten colonizar órganos específicos.

35 El documento US 2011/269637 A1 describe un método para predecir el desenlace clínico de un paciente con NSCLC basándose en el nivel de expresión de los genes GRM8, NRF1, USP7, PRO0149, TXNL48, GLG1, ZNRF1 y UBE2L3. Este documento también describe una disminución significativa del riesgo de recaída asociada con la eliminación de la región 16q22-24, lo que sugiere que esto se debe a la eliminación del oncogén MAF.

40 Sin embargo, no hay marcadores genéticos, en el estado de la técnica, que permitan el diagnóstico y/o el pronóstico de si un paciente que padece un cáncer de pulmón específico, tal como cáncer de pulmón NSCLC, padecerá o no metástasis, por tanto una terapia adecuada que se puede aplicar al sujeto que padece dicho cáncer. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar nuevos marcadores que permitan diagnosticar la presencia de metástasis en sujetos que padecen cáncer de pulmón y/o predecir la probabilidad de que un sujeto que padece cáncer de pulmón desarrolle metástasis, en particular metástasis ósea. La identificación de nuevos factores de pronóstico servirá como guía para seleccionar los tratamientos más adecuados.

45 La identificación de marcadores que predicen la metástasis ósea brindaría una oportunidad terapéutica preventiva al imponer restricciones a la diseminación y colonización del tejido metastático óseo por parte de las células pulmonares y retrasar o transformar una afección mortal. Los inventores identificaron la ganancia genómica de c-MAF y 16q22-24, como un gen y una alteración genómica de metástasis ósea de cáncer de pulmón asociado

genuino, en una realización preferida metástasis ósea de próstata osteolítica.

Breve resumen de la invención

5 Los inventores de la presente invención han determinado que la identificación del equilibrio de las señales que afectan la metástasis de células de cáncer de pulmón diseminado, en particular metástasis ósea, proporcionaría información valiosa para establecer el pronóstico de, y para la intervención terapéutica preventiva contra, la enfermedad. Los inventores identificaron que MAF y la ganancia genómica de 16q22-24 juegan un papel en el impulso de lesiones de metástasis de pulmón a hueso, en particular metástasis ósea osteolítica.

10 Los inventores de la presente invención han identificado c-MAF como un marcador asociado con una mayor tendencia del cáncer de pulmón a causar metástasis y, particularmente, metástasis ósea. La sobreexpresión de MAF parece deberse a una amplificación del locus 16q22-q24 en el que está situado el gen c-MAF.

15 Los niveles de expresión de c-MAF se estudiaron en dos cohortes de pacientes. La primera cohorte contenía los perfiles de expresión y las notas clínicas de tumores primarios de pacientes con cáncer de pulmón. La segunda cohorte de pacientes estaba en forma de una micromatriz multigénica tisular compuesta por biopsias de tumores primarios de pulmón, incluyendo 9 tumores que desarrollaron metástasis en el hueso, 16 tumores que desarrollaron metástasis en otros sitios, excepto el hueso y tenían un seguimiento clínico mínimo de 5 años y 49 tumores primarios de pulmón que nunca desarrollaron metástasis con un seguimiento clínico mínimo de 5 años, el gen c-MAF (ARNm) y la expresión de proteínas en células y biopsia tumorales se correlacionan positivamente con diferentes parámetros clínicos, incluida la recurrencia, metástasis, metástasis ósea y supervivencia global observada. Además, estos estudios mostraron el papel de c-MAF como marcador para el pronóstico y como un gen diana en la metástasis del cáncer de pulmón, particularmente metástasis ósea. Asimismo, los inventores han asociado la

20
25

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón y/o para el pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón, que comprende:

30

- (i) cuantificar el número de copias de c-MAF en una muestra de tumor de dicho sujeto y
- (ii) comparar el número de copias obtenido previamente con el número de copias de dicho gen en una muestra de control,

35 en el que si el número de copias de dicho gen aumenta con respecto al número de copias de dicho gen en la muestra de control, entonces dicho sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto con cáncer de pulmón, que comprende:

- (i) cuantificar la ganancia del número de copias de 16q22-24 en una muestra de tumor de dicho sujeto y
 - (ii) comparar el número de copias obtenido previamente con el número de copias de dicha región en una muestra de control,
- 45

en el que si el número de copias de 16q22-24 ha crecido con respecto a la muestra de control, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia con el objetivo de prevenir y/o tratar la metástasis.

50 En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón y/o para el pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón, que comprende determinar si el gen c-MAF está amplificado en una muestra de tumor de dicho sujeto, en el que si dicho gen está amplificado, entonces dicho sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis, en el que la amplificación del gen c-MAF se determina por medio de la determinación de la

55

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para tipar una muestra de un sujeto que padece cáncer de pulmón, comprendiendo el método:

- a) proporcionar una muestra de tumor de dicho sujeto;
 - b) cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en dicha muestra;
 - c) tipar dicha muestra comparando el nivel de expresión cuantificado de c-MAF con un nivel de referencia predeterminado de expresión de c-MAF;
- 60

65 en el que dicho tipado proporciona información de pronóstico relacionada con el riesgo de metástasis ósea en dicho sujeto, en el que si el nivel de expresión de dicho gen aumenta con respecto al nivel de expresión de dicho gen en la

muestra de control, entonces dicho sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis.

Breve descripción de los dibujos/las figuras

- 5 FIGURA 1: La expresión génica de c-MAF en tumores primarios de pulmón se correlaciona significativamente con la metástasis como se observa en el gráfico de Kaplan Meier y se destaca por el CRI y el valor p obtenidos.
- 10 FIGURA 2: a) gráfico de Kaplan-Meier que representa la probabilidad de supervivencia libre de metástasis ósea en cualquier momento en la población general de pacientes con cáncer de pulmón después de la resección del tumor primario, b) gráfico de Kaplan-Meier que representa la probabilidad de supervivencia libre de metástasis ósea en cualquier momento en biopsias de tumores primarios de cáncer de pulmón de acuerdo con las categorías de expresión de proteínas alta o baja de c-MAF medida por inmunohistoquímica (IHC). El valor de corte de la expresión de c-MAF (Densidad óptica 20.000, D.O., Unidades) se seleccionó basándose en una curva operativa del receptor (curva ROC) según métodos estándar (el área bajo la curva, AUC, es 0,80).
- 15 FIGURA 3: a) Diagrama de Kaplan-Meier que representa la probabilidad de supervivencia en la población general de pacientes con cáncer de pulmón desde el momento de la resección del tumor primario, b) gráfico de Kaplan-Meier que representa la probabilidad de supervivencia en cáncer de pulmón primario de acuerdo con las categorías de expresión de proteínas alta o baja de c-MAF. El valor de corte de la expresión de c-MAF (Densidad óptica 20.000, D.O., Unidades) se seleccionó basándose en una curva operativa del receptor (curva ROC) basada en metástasis ósea en cualquier momento según métodos estándar.
- 20

Descripción detallada

Métodos para el diagnóstico y el pronóstico de metástasis del cáncer de pulmón basándose en los niveles de expresión de c-MAF

25 Los inventores han identificado que el gen y la proteína de c-MAF están sobreexpresados en la metástasis del cáncer de pulmón y que los niveles de expresión de c-MAF en tumores de pulmón primarios se correlacionan con diferentes parámetros clínicos del cáncer de pulmón, particularmente con la probabilidad de recurrencia y de metástasis. Por tanto, la sobreexpresión de c-MAF se correlaciona con la aparición de metástasis en tumores de pulmón en el hueso. Por lo tanto, c-MAF se puede usar como marcador para el diagnóstico y/o el pronóstico de metástasis, en particular metástasis ósea, en un sujeto con cáncer de pulmón.

30

35 Por tanto, en un aspecto, Se desvela un método *in vitro* para el diagnóstico de metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón y/o para el pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón (en lo sucesivo primer método desvelado), que comprende

- 40 (i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tumor (por ejemplo, tejido tumoral de pulmón, célula tumoral de pulmón circulante, ADN de tumor de pulmón circulante) de dicho sujeto y
 (ii) comparar el nivel de expresión obtenido previamente con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra de control,

45 en el que si los niveles de expresión de dicho gen aumentan con respecto a los niveles de expresión de dicho gen en la muestra de control, entonces dicho sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis, en un sitio preferido, metástasis ósea.

50 El gen c-MAF (homólogo de oncogén de fibrosarcoma musculoesquelético v-maf (avian) también conocido como MAF o MGC71685) es un factor de transcripción que contiene una cremallera de leucina que actúa como un homodímero o un heterodímero. Dependiendo del sitio de unión al ADN, la proteína codificada puede ser un activador o un represor transcripcional. La secuencia de ADN que codifica c-MAF se describe en la base de datos NCBI con el número de acceso NG_016440 (SEQ ID NO: 1). La secuencia codificante de c-MAF se expone en la SEQ ID N°: 13. Dos ARN mensajeros se transcriben a partir de dicha secuencia de ADN, cada uno de las cuales dará lugar a una de las dos isoformas de la proteína c-MAF, la isoforma α y la isoforma β . Las secuencias de ADN complementarias para cada una de dichas isoformas se describen, respectivamente, en la base de datos NCBI con los números de acceso NM_005360.4 (SEQ ID NO: 2) y NM_001031804.2 (SEQ ID NO: 3).

55

60 En el contexto de la presente invención, la "metástasis" se entiende como la propagación de un cáncer desde el órgano donde comenzó a un órgano diferente. Generalmente se produce a través de la sangre o del sistema linfático. Cuando las células cancerosas se diseminan y forman un nuevo tumor, este último se denomina tumor secundario o metastático. Las células cancerosas que forman el tumor secundario son como las del tumor original. Si un cáncer de pulmón, por ejemplo, se disemina (metastatiza) al hueso, el tumor secundario está formado por células malignas de cáncer de pulmón. La enfermedad en el hueso es cáncer de pulmón metastático y no cáncer de huesos. En una realización particular del método desvelado, la metástasis es un cáncer de pulmón que se ha diseminado (metastatizado) al hueso.

65

En la presente invención, se entiende por "diagnóstico de metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón" la

identificación de una enfermedad (metástasis) por medio del estudio de sus signos, es decir, en el contexto de la presente divulgación por medio de niveles de expresión del gen c-MAF aumentados (es decir, sobreexpresión) en el tejido tumoral del cáncer de pulmón con respecto a una muestra de control.

5 En la presente invención, se entiende por "pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón" saber basándose en los signos si el cáncer de pulmón que dicho sujeto tiene metastatizará en el futuro. En el contexto de la presente divulgación, el signo es la sobreexpresión del gen c-MAF en tejido tumoral.

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

15 En una realización preferida, el primer método desvelado comprende cuantificar solo el nivel de expresión del gen c-MAF como un marcador único, es decir, el método no implica determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional.

20 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, aunque sin limitación, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, oveja, cabras, perros, gatos o roedores. Preferentemente, el sujeto es un hombre o mujer humana de cualquier edad o raza.

25 Los términos "malo" o "bueno", como se usan en el presente documento para referirse a un desenlace clínico, significan que el sujeto mostrará un desenlace favorable o desfavorable. Como entenderán los expertos en la materia, dicha evaluación de la probabilidad, aunque se prefiere que lo sea, puede no ser correcta para el 100 % de los sujetos a diagnosticar. El término requiere, sin embargo, que una parte estadísticamente significativa de los sujetos pueda identificarse como con una predisposición para un desenlace dado. El experto en la materia puede determinar fácilmente si una parte es estadísticamente significativa mediante el uso de diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Detalles se encuentran en Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos aproximadamente al 50 %, al menos aproximadamente al 60 %, al menos aproximadamente al 70 %, al menos aproximadamente al 80 %, al menos aproximadamente al 90 % al menos aproximadamente al 95 %. Los valores p son, preferentemente, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001 o menos. Más preferentemente, al menos aproximadamente el 60 por ciento, al menos aproximadamente el 70 por ciento, al menos aproximadamente el 80 por ciento o al menos aproximadamente el 90 por ciento de los sujetos de una población pueden identificarse adecuadamente mediante el método de la presente divulgación.

40 En la presente invención, "muestra de tumor" se entiende como la muestra (por ejemplo, tejido tumoral, célula tumoral circulante, ADN tumoral circulante) que se origina a partir del tumor primario de cáncer de pulmón. Dicha muestra se puede obtener mediante métodos convencionales, por ejemplo, biopsia, usando métodos bien conocidos por los expertos en técnicas médicas relacionadas. Los métodos para obtener una muestra de biopsia incluyen dividir un tumor en trozos grandes, o microdissección, u otros métodos de separación de células conocidos en la técnica. Las células tumorales pueden obtenerse adicionalmente mediante citología a través de aspiración con una aguja de pequeño calibre. Para simplificar la conservación y el manejo de la muestra, las muestras pueden fijarse en formalina y empaparse en parafina o primero congelarse y luego empaparse en un medio de congelación de tejidos tal como el compuesto OCT por medio de inmersión en un medio altamente criogénico que permite una congelación rápida.

50 Como lo entiende el experto en la materia, los niveles de expresión del gen pueden cuantificarse midiendo los niveles de ARN mensajero de dicho gen o de la proteína codificada por dicho gen.

55 Para este fin, la muestra biológica puede tratarse para romper física o mecánicamente el tejido o la estructura celular, liberando los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para preparar ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se extraen mediante métodos disponibles en el mercado conocidos por el experto en la materia (Sambroock, J., *et al.*, "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3).

60 Por tanto, el nivel de expresión del gen c-MAF se puede cuantificar a partir del ARN resultante de la transcripción de dicho gen (ARN mensajero o ARNm) o, como alternativa, del ADN complementario (ADNc) de dicho gen. Por lo tanto, en una realización particular de la divulgación, la cuantificación de los niveles de expresión del gen c-MAF comprende la cuantificación del ARN mensajero del gen c-MAF o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario del gen c-MAF o un fragmento de dicho ADNc o sus mezclas.

65 Se puede usar virtualmente cualquier método convencional dentro del alcance de la divulgación para detectar y cuantificar los niveles de ARNm codificado por el gen c-MAF o de su correspondiente ADNc. A modo de ilustración no limitante, los niveles de ARNm codificado por dicho gen pueden cuantificarse usando métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden amplificación de ARNm y la cuantificación de dicho producto de amplificación

de ARNm, tales como electroforesis y tinción, o como alternativa, mediante transferencia de Southern y usando sondas adecuadas, transferencia de Northern y usando sondas específicas del ARNm del gen de interés (c-MAF) o de su correspondiente ADNc, mapeo con nucleasa S1, RT-PCR, hibridación, micromatrices, etc., preferentemente por medio de PCR cuantitativa en tiempo real usando un marcador adecuado. Asimismo, los niveles de ADNc correspondiente a dicho ARNm codificado por el gen c-MAF también se pueden cuantificar mediante el uso de técnicas convencionales; en este caso, el método desvelado incluye una etapa para sintetizar el ADNc correspondiente por medio de transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente, seguida de la amplificación y cuantificación de dicho producto de amplificación de ADNc. Los métodos convencionales para cuantificar los niveles de expresión se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001. (mencionado *anteriormente*).

En un aspecto particular, los niveles de expresión del gen c-MAF se cuantifican por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o una matriz de ADN o ARN.

Además, el nivel de expresión del gen c-MAF también se puede cuantificar por medio de la cuantificación de los niveles de expresión de la proteína codificada por dicho gen, es decir, la proteína c-MAF (c-MAF) [NCBI, número de acceso O75444], o cualquier otra variante funcionalmente equivalente de la proteína c-MAF. Hay dos isoformas de la proteína c-MAF, la isoforma α (NCBI, NP_005351.2) compuesta por 403 aminoácidos (SEQ ID NO: 4) y la isoforma β (NP_001026974.1) compuesta por 373 aminoácidos (SEQ ID NO: 5). El nivel de expresión del gen c-MAF se puede cuantificar por medio de la cuantificación de los niveles de expresión de cualquiera de las isoformas de la proteína c-MAF. Por tanto, en un aspecto particular, la cuantificación de los niveles de la proteína codificada por el gen c-MAF comprende la cuantificación de la proteína c-MAF.

En el contexto de la presente divulgación, "variante funcionalmente equivalente de la proteína c-MAF" se entiende como (i) variantes de la proteína c-MAF (SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5) en las que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado), en el que dicho residuo de aminoácido sustituido puede o no estar codificado por el código genético, o (ii) variantes que comprenden una inserción o una eliminación de uno o más aminoácidos y que tienen la misma función que la proteína c-MAF, es decir, que actúan como un factor de transcripción de unión al ADN. Las variantes de la proteína c-MAF se pueden identificar usando métodos basados en la capacidad de c-MAF para promover la proliferación celular *in vitro* como se muestra en la solicitud de patente internacional WO2005/046731, basada en la capacidad del llamado inhibidor para bloquear la capacidad de transcripción de un gen indicador bajo el control del promotor de ciclina D2 o de un promotor que contiene la región sensible a c-MAF (elemento sensible a MARE o c-MAF) en células que expresan c-MAF como se describe en el documento WO2008098351, o basándose en la capacidad del llamado inhibidor para bloquear la expresión del gen indicador bajo el control del promotor IL-4 en respuesta a la estimulación con PMA/ionomicina en células que expresan NFATc2 y c-MAF como se describe en el documento US2009048117A.

Las variantes de acuerdo con la divulgación tienen preferentemente una similitud de secuencias con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las isoformas de la proteína c-MAF (SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5) de al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %. El grado de similitud entre las variantes y las secuencias de proteínas específicas de c-MAF definidas previamente se determina mediante algoritmos y procesos informáticos que son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. La similitud entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP [BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

El nivel de expresión de la proteína c-MAF se puede cuantificar mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de un sujeto. A modo de ilustración no limitante, dichos niveles de proteína se pueden cuantificar, por ejemplo, usando anticuerpos con capacidad de unión a c-MAF (o un fragmento del mismo que contiene un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos usados en estos ensayos pueden o no estar etiquetados. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden usar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos de quimioluminiscencia, sustratos o cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, partículas, tintes, etc. Existe una amplia gama de ensayos conocidos que se pueden usar en la presente divulgación, que usan anticuerpos no etiquetados (anticuerpo primario) y anticuerpos etiquetados (anticuerpo secundario); estas técnicas incluyen Western-blot o transferencia de Western, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA en sándwich de doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de micromatrices o biochips de proteínas, incluyendo anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas. Otras formas de detectar y cuantificar dicha proteína c-MAF incluyen técnicas de cromatografía por afinidad, ensayos de unión a ligandos, etc. Cuando se usa un método inmunológico, puede usarse cualquier anticuerpo o reactivo que se sepa que se une a la proteína c-MAF con una alta afinidad para detectar la cantidad de los mismos. No obstante, el uso de un anticuerpo, por ejemplo, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos humanizados, triacuerpos, tetracuerpos, nanocuerpos, alfacuerpos, péptidos grapados, ciclopéptidos y anticuerpos. Hay

anticuerpos anti-proteína c-MAF comerciales en el mercado que se pueden usar en el contexto de la presente divulgación, tales como por ejemplo los anticuerpos ab427, ab55502, ab55502, ab72584, ab76817, ab77071 (Abcam plc, 330 Science Park, Cambridge CB4 0FL, Reino Unido), el anticuerpo monoclonal O75444 (anticuerpo monoclonal anti-MAF humana de ratón libre de azida, no conjugado, clon 6b8) de AbD Serotec, etc. Hay muchas compañías comerciales que ofrecen anticuerpos anti-c-MAF, tales como Abnova Corporation, Bethyl Laboratories, Santa Cruz Biotechnology, Bioworld Technology, GeneTex, etc.

En un aspecto particular, los niveles de proteína c-MAF se cuantifican por medio de transferencia de Western, inmunohistoquímica, ELISA o una matriz de proteínas.

En otro aspecto particular, los niveles de proteína c-MAF se cuantifican a partir de exosomas o ADN circulante. Los exosomas son vesículas de membrana de 40 a 100 nm secretadas por la mayoría de los tipos de células *in vivo* e *in vitro*. Los exosomas se forman en una población particular de endosomas, llamados cuerpos multivesiculares (MVB) por gemación hacia el interior de la luz del compartimento. Tras la fusión de los MVB con la membrana plasmática, estas vesículas internas se secretan. Los exosomas se pueden aislar de diversas líneas celulares o fluidos corporales mediante varios métodos bien conocidos en la técnica (Théry C. et al., *Curr Protoc Cell Biol.* abril de 2006; capítulo 3: unidad 3.22). Varios kits comerciales están disponibles para el aislamiento de exosomas tales como ExoQuick™ o ExoTest™.

El primer método desvelado comprende, en una segunda etapa, la comparación del nivel de expresión del gen c-MAF obtenido en la muestra de tumor (que incluye, aunque sin limitación, una biopsia de tumor primario, células tumorales circulantes y ADN tumoral circulante) del sujeto con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra de control.

Una vez que el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tejido tumoral, una célula tumoral circulante o un ADN tumoral circulante de un sujeto con cáncer de pulmón se ha medido y comparado con la muestra de control, si el nivel de expresión de dicho gen aumenta con respecto a su nivel de expresión en la muestra de control, entonces se puede concluir que dicho sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis.

La determinación del nivel de expresión del gen c-MAF debe correlacionarse con los valores de una muestra de control o una muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor a analizar, la naturaleza exacta de la muestra de control puede variar. Por tanto, en el caso de que se vaya a evaluar un diagnóstico, entonces la muestra de referencia es una muestra de tejido tumoral de un sujeto con cáncer de pulmón que no ha metastatizado o que corresponde al valor mediano de los niveles de expresión del gen c-MAF medidos en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de pulmón que no ha metastatizado.

Dicha muestra de referencia se obtiene normalmente combinando cantidades iguales de muestras de una población de sujetos. En general, las muestras de referencia típicas se obtendrán de sujetos que están clínicamente bien documentados y en los que la ausencia de metástasis está bien caracterizada. En dichas muestras, las concentraciones normales (concentración de referencia) del biomarcador (gen c-MAF) se pueden determinar, por ejemplo, proporcionando la concentración media en la población de referencia. Se tienen en cuenta diversas consideraciones al determinar la concentración de referencia del marcador. Entre dichas consideraciones están la edad, el peso, el sexo, la condición física general del paciente y similares. Por ejemplo, cantidades iguales de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 a preferentemente más de 1000 sujetos, preferentemente clasificados de acuerdo con las consideraciones anteriores, por ejemplo de acuerdo con varias categorías de edad, se toman como grupo de referencia. La colección de muestras de la que se deriva el nivel de referencia estará formada preferentemente por sujetos que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente objeto del estudio (por ejemplo, cáncer de pulmón). De manera similar, el valor de referencia dentro de una cohorte de pacientes se puede establecer usando una curva operativa del receptor (ROC) y midiendo el área bajo la curva para todos los pares de sensibilidad y especificidad para determinar qué par proporciona los mejores valores y a qué valor de referencia corresponde.

Una vez que se ha establecido este valor mediano o de referencia, se puede comparar el nivel de este marcador expresado en tejidos tumorales de pacientes con este valor mediano y, por lo tanto, asignarse al nivel de expresión "aumentado". Debido a la variabilidad entre los sujetos (por ejemplo, aspectos relacionados con la edad, la raza, etc.) es muy difícil (si no virtualmente imposible) establecer valores de referencia absolutos de la expresión de c-MAF. Por tanto, en aspectos particulares, los valores de referencia para la expresión "aumentada" o "reducida" de la expresión de c-MAF se determinan calculando los percentiles mediante medios convencionales, lo que implica realizar ensayos en una o varias muestras aisladas de sujetos cuya enfermedad está bien documentada mediante cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para los niveles de expresión de c-MAF. Los niveles "reducidos" de c-MAF pueden asignarse a continuación preferentemente a muestras en las que los niveles de expresión de c-MAF son iguales o inferiores al percentil 50 en la población normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de expresión iguales o inferiores al percentil 60 en la población normal, iguales o inferiores al percentil 70 en la población normal, iguales o inferiores al percentil 80 en la población normal, iguales o inferiores al percentil 90 en la población normal, e iguales o inferiores al percentil 95 en la población normal. Los niveles de expresión del gen c-

MAF "aumentados" puede asignarse entonces preferentemente a muestras en las que los niveles de expresión del gen c-MAF son iguales o superiores al percentil 50 en la población normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de expresión iguales o superiores al percentil 60 en la población normal, iguales o superiores al percentil 70 en la población normal, iguales o superiores al percentil 80 en la población normal, iguales o superiores al percentil 90 en la población normal, e iguales o superiores al percentil 95 en la población normal.

En la presente divulgación, "niveles de expresión aumentados" se entiende como el nivel de expresión cuando se refiere a los niveles del gen c-MAF mayores que aquellos en una muestra de referencia o muestra de control. Particularmente, se puede considerar que una muestra tiene altos niveles de expresión de c-MAF cuando los niveles de expresión en la muestra de referencia son al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a la muestra aislada del paciente.

En el contexto de la presente invención, se entiende que "un sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis" cuando el cáncer de pulmón padecido por dicho sujeto ha metastatizado a otros órganos del cuerpo, en una realización particular, al hueso.

En un aspecto aún más preferido, la metástasis al hueso es una metástasis ósea osteolítica. Como se usa en el presente documento, la expresión "metástasis ósea osteolítica" se refiere a un tipo de metástasis en la que se produce una resorción ósea (pérdida progresiva de la densidad ósea) en las inmediaciones de la metástasis que resulta de la estimulación de la actividad de los osteoclastos por las células tumorales y se caracteriza por dolor severo, fracturas patológicas, hipercalcemia, compresión de la médula espinal y otros síndromes resultantes de la compresión nerviosa.

Por otro lado, en la presente invención se entiende que "un sujeto tiene una mayor tendencia a desarrollar metástasis" cuando las probabilidades de que el cáncer de pulmón padecido por el sujeto metastatice en el futuro son altas.

El experto en la materia entenderá que la predicción de la tendencia a la metástasis de un tumor de pulmón primario no pretende ser correcta para todos los sujetos a identificar (es decir, para el 100 % de los sujetos). No obstante, el término requiere permitir la identificación de una parte estadísticamente significativa de los sujetos (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohortes). El experto en la materia puede determinar de manera sencilla si una parte es estadísticamente significativa, usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de los intervalos de confianza, la determinación de los valores p, prueba de la T de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Detalles se proporcionan en Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley and Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos al 90 %, al menos al 95 %, al menos al 97 %, al menos al 98 % o al menos ea 99 %. Los valores p son preferentemente 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Más preferentemente, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de los sujetos de una población se pueden identificar adecuadamente mediante el método de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, "agente para evitar o prevenir la degradación ósea" se refiere a cualquier molécula capaz de prevenir, inhibir, tratar, reducir o detener la degradación ósea, ya sea estimulando la proliferación de osteoblastos o inhibiendo la proliferación de osteoclastos o fijando la estructura ósea.

Como se usa en el presente documento, un "agente inhibidor de c-MAF" se refiere a cualquier molécula capaz de inhibir total o parcialmente la expresión del gen c-MAF, tanto impidiendo que se produzca el producto de expresión de dicho gen (interrumpiendo la transcripción del gen de c-MAF y/o bloqueando la traducción del ARNm procedente de la expresión del gen c-MAF) como inhibiendo directamente la actividad de la proteína c-MAF. Los inhibidores de la expresión del gen c-MAF se pueden identificar usando métodos basados en la capacidad del llamado inhibidor para bloquear la capacidad de c-MAF para promover la proliferación celular *in vitro*, como se muestra en la solicitud de patente internacional WO2005/046731, basándose en la capacidad del llamado inhibidor para bloquear la capacidad de transcripción de un gen indicador bajo el control del promotor de la ciclina D2 o de un promotor que contiene la región de respuesta a c-MAF (elemento sensible a MARE o c-MAF) en células que expresan c-MAF tal como se describe en el documento WO2008098351 o basándose en la capacidad del llamado inhibidor para bloquear la expresión de un gen indicador bajo el control del promotor de IL-4 en respuesta a la estimulación con PMA/ionomicina en células que expresan NFATc2 y c-MAF tal como se describe en el documento US2009048117A.

Como se usa en el presente documento, la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR) o "mTor" se refiere a aquellas proteínas que corresponden a EC 2.7.11.1. Las enzimas mTor son serina/reonina proteína cinasas y regulan la proliferación celular, la motilidad, el crecimiento celular, la supervivencia celular y la transcripción.

Como se usa en el presente documento, un "inhibidor de mTor" se refiere a cualquier molécula capaz de inhibir total o parcialmente la expresión del gen mTor, tanto impidiendo que se produzca el producto de expresión de dicho gen (interrumpiendo la transcripción del gen mTor y/o bloqueando la traducción del ARNm procedente de la expresión del gen mTor) como inhibiendo directamente la actividad de la proteína mTor. Los inhibidores de mTor incluyen inhibidores que tienen una o más dianas además de la inhibición de la actividad de mTor.

Como se usa en el presente documento, "Src" se refiere a aquellas proteínas que corresponden a EC 2.7.10.2. Src es una tirosina cinasa no receptora y un protooncogén. Src puede desempeñar un papel en el crecimiento celular y el desarrollo embrionario.

5 Como se usa en el presente documento, un "inhibidor de Src" se refiere a cualquier molécula capaz de inhibir total o parcialmente la expresión del gen Src, tanto impidiendo que se produzca el producto de expresión de dicho gen (interrumpiendo la transcripción del gen Src y/o bloqueando la traducción del ARNm procedente de la expresión del gen Src) como inhibiendo directamente la actividad de la proteína Src.

10 Como se usa en el presente documento, "prostaglandina-endoperoxido sintasa 2", "ciclooxigenasa-2" o "COX-2" se refiere a aquellas proteínas que corresponden a EC 1.14.99.1. La COX-2 es responsable de convertir el ácido araquidónico en el endoperoxido de prostaglandina H2.

15 Como se usa en el presente documento, un "inhibidor de COX-2" se refiere a cualquier molécula capaz de inhibir total o parcialmente la expresión del gen COX-2, tanto impidiendo que se produzca el producto de expresión de dicho gen (interrumpiendo la transcripción del gen COX-2 y/o bloqueando la traducción del ARNm procedente de la expresión del gen COX-2) como inhibiendo directamente la actividad de la proteína COX-2.

20 Como se usa en el presente documento, "desenlace" o "desenlace clínico" se refiere al curso resultante de la enfermedad y/o la progresión de la enfermedad y se puede caracterizar, por ejemplo, por recurrencia, período de tiempo hasta la recurrencia, metástasis, período de tiempo hasta la metástasis, número de metástasis, número de sitios de metástasis y/o muerte debida a la enfermedad. Por ejemplo, un buen desenlace clínico incluye curación, prevención de recurrencia, prevención de metástasis y/o supervivencia dentro de un período de tiempo fijado (sin recurrencia), y un mal desenlace clínico incluye progresión de la enfermedad, metástasis y/o muerte dentro de un período de tiempo fijado.

25 "Predicción", como se usa en el presente documento, se refiere a la determinación de la probabilidad de que el sujeto que padece cáncer de pulmón desarrolle metástasis a un órgano distante. Como se usa en el presente documento, "buen pronóstico" indica que se espera (por ejemplo se predice) que el sujeto sobreviva y/o no tenga, o tenga un bajo riesgo de tener, recurrencia o metástasis distante dentro de un período de tiempo establecido. El término "bajo" es un término relativo y, en el contexto de esta solicitud, se refiere al riesgo del grupo de expresión "bajo" con respecto a un desenlace clínico (recurrencia, metástasis a distancia, etc.). Un riesgo "bajo" se puede considerar como un riesgo más bajo que el riesgo promedio para una población heterogénea de pacientes con cáncer. En el estudio de Paik et al. (2004), un riesgo global de recurrencia "bajo" se consideró inferior al 15 por ciento. El riesgo también variará en función del período de tiempo. El período de tiempo puede ser, por ejemplo, cinco años, diez años, quince años o incluso veinte años después del diagnóstico inicial de cáncer o después de que se realizó el pronóstico.

30 Como se usa en el presente documento, "mal pronóstico" indica que se espera, por ejemplo se predice, que el sujeto no sobreviva y/o tenga, o tenga un alto riesgo de tener, recurrencia o metástasis distante dentro de un período de tiempo establecido. El término "alto" es un término relativo y, en el contexto de esta solicitud, se refiere al riesgo del grupo de expresión "alto" con respecto a un desenlace clínico (recurrencia, metástasis a distancia, etc.). Un riesgo "alto" se puede considerar como un riesgo más alto que el riesgo promedio para una población heterogénea de pacientes con cáncer. En el estudio de Paik et al. (2004), un riesgo global de recurrencia "alto" se consideró superior al 15 por ciento. El riesgo también variará en función del período de tiempo. El período de tiempo puede ser, por ejemplo, cinco años, diez años, quince años o incluso veinte años del diagnóstico inicial de cáncer o después de que se realizó el pronóstico.

35 "Valor de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere a un valor de laboratorio usado como referencia para los valores/datos obtenidos mediante exámenes de laboratorio de pacientes o muestras recogidas de pacientes. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto; un valor relativo; un valor que tiene un límite superior y/o inferior; un intervalo de valores; un valor promedio; un valor de mediana, un valor medio, o un valor que se compara con un valor de control o inicial concreto. Un valor de referencia puede estar basado en un valor de la muestra individual, tal como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que se está analizando, pero en un punto anterior en el tiempo. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, tal como en una población de sujetos del grupo de la misma edad cronológica, o basarse en un conjunto de muestras que incluyen o excluyen la muestra a analizar.

40 El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de terapia, que pretende terminar, prevenir, mejorar o reducir la susceptibilidad a una afección clínica como se describe en el presente documento. En un aspecto preferido, el término tratamiento se refiere al tratamiento profiláctico (es decir, una terapia para reducir la susceptibilidad a una afección clínica), de un trastorno o afección como se define en el presente documento. Por tanto, "tratamiento" "tratar" y sus términos equivalentes se refieren a obtener un efecto farmacológico o fisiológico deseado, que cubra cualquier tratamiento de una afección o trastorno patológico en un mamífero, incluyendo un ser humano. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente un trastorno o síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en términos de una curación parcial o

completa para un trastorno y/o un efecto adverso atribuible al trastorno. Es decir, "tratamiento" incluye (1) prevenir que el trastorno se produzca o se repita en un sujeto, (2) inhibir el trastorno, tal como detener su desarrollo, (3) detener o terminar el trastorno o al menos los síntomas asociados con el mismo, de modo que el huésped ya no sufre el trastorno o sus síntomas, tal como causar la regresión del trastorno o sus síntomas, por ejemplo, al restaurar o reparar una función perdida, faltante o defectuosa, o al estimular un proceso ineficiente, o (4) mitigar, aliviar o mejorar el trastorno, o los síntomas asociados con el mismo, donde mejorar se usa en un sentido amplio para referirse a al menos una reducción en la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor o inmunodeficiencia.

Como se usa en el presente documento, "muestra" o "muestra biológica" significa material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para determinar el nivel de expresión del gen c-MAF. La muestra se puede aislar de cualquier tejido o fluido biológico adecuado, tal como, por ejemplo, tejido tumoral, sangre, plasma en sangre, suero, orina o líquido cefalorraquídeo (LCR).

Como se usa en el presente documento, la expresión "nivel de expresión" de un gen como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad medible de producto génico producido por el gen en una muestra del sujeto, en el que el producto génico puede ser un producto de transcripción o un producto de traducción. Por consiguiente, el nivel de expresión puede pertenecer a un producto génico de ácido nucleico tal como ARNm o ADNc o un producto génico polipeptídico. El nivel de expresión se deriva de una muestra de un sujeto y/o una muestra o muestras de referencia y, por ejemplo, puede detectarse de novo o corresponder a una determinación previa. El nivel de expresión se puede determinar o medir, por ejemplo, usando métodos de micromatrices, métodos de PCR (tales como qPCR) y/o métodos basados en anticuerpos, como es conocido por un experto en la materia.

Como se usa en el presente documento, el término "número de copias del gen" se refiere al número de copias de una molécula de ácido nucleico en una célula. El número de copias del gen incluye el número de copias del gen en el ADN genómico (cromosómico) de una célula. En una célula normal (célula no tumoral), el número de copias del gen es normalmente dos copias (una copia en cada miembro del par de cromosomas). El número de copias del gen a veces incluye la mitad del número de copias del gen tomado de muestras de una población celular.

"Nivel de expresión aumentado" se entiende como el nivel de expresión cuando se refiere a los niveles del gen c-MAF mayores que aquellos en una muestra de referencia o muestra de control. Estos niveles aumentados pueden ser causados, sin excluir otros mecanismos, por la amplificación o translocación de un gen o del locus cromosómico 16q23 o 16q22-24. Particularmente, se puede considerar que una muestra tiene un alto nivel de expresión de c-MAF cuando el nivel de expresión en la muestra aislada del paciente es al menos 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a la referencia o control.

"Sonda", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de oligonucleótidos que es complementaria a una secuencia específica de ácido nucleico de interés. En algunos aspectos, las sondas pueden ser específicas de regiones de cromosomas que se sabe que experimentan translocaciones. En algunos aspectos, las sondas tienen una etiqueta o identificador específico. En algunos aspectos, el identificador es un fluoróforo. En algunos aspectos, la sonda es una sonda de hibridación in situ de ADN cuyo etiquetado se basa en la unión coordinativa estable del platino a ácidos nucleicos y proteínas. En algunos aspectos, la sonda se describe en Swennenhuis et al. "Construction of repeat-free fluorescence in situ hybridization probes" *Nucleic Acids Research* 40(3): e20 (2012).

"Identificador" o "etiqueta", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula física que está directa o indirectamente asociada con una sonda, que permite que la sonda o la ubicación de la sonda se visualice, marque o capture de otra manera.

"Translocación", como se usa en el presente documento, se refiere al intercambio de material cromosómico en cantidades desiguales o iguales entre los cromosomas. En algunos casos, la translocación es en el mismo cromosoma. En algunos casos, la translocación es entre diferentes cromosomas. Las translocaciones se producen con una alta frecuencia en muchos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama y leucemia. Las translocaciones pueden ser translocaciones recíprocas primarias o las translocaciones secundarias más complejas. Hay varias translocaciones primarias que implican el locus de la cadena pesada de inmunoglobina (IgH) que se cree que constituyen el acontecimiento de inicio en muchos cánceres. (Eychène, A., Rocques, N., y Puoponnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. *Nature Reviews: Cancer*. 8: 683-693).

"Poliploide" o "poliploidía", como se usa en el presente documento, indica que la célula contiene más de dos copias de un gen de interés. En algunos casos, el gen de interés es MAF. En algunos aspectos, la poliploidía se asocia con una acumulación de expresión del gen de interés. En algunos aspectos, la poliploidía se asocia con inestabilidad genómica. En algunos aspectos, la inestabilidad genómica puede causar translocaciones cromosómicas.

"Secuenciación del genoma completo", como se usa en el presente documento, es un proceso por el cual el genoma completo de un organismo se secuencia en una sola vez. Véase, por ejemplo, Ng., P.C. y Kirkness, E.F., Whole Genome Sequencing. 2010. *Methods in Molecular Biology*. 628:215-226.

"Secuenciación del exoma", como se usa en el presente documento, es un proceso por el cual se secuencian la región codificante completa del ADN de un organismo. En la secuenciación del exoma, se secuencian el ARNm. Las regiones no traducidas del genoma no se incluyen en la secuenciación del exoma. Véase, por ejemplo, Choi, M. et al., Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. 2009. PNAS. 106(45): 19096-19101.

"Muestra de tejido tumoral" se entiende como la muestra de tejido que se origina a partir del tumor de cáncer de pulmón, incluyendo, aunque sin limitación, las células tumorales circulantes y el ADN tumoral circulante. Dicha muestra se puede obtener mediante métodos convencionales, por ejemplo, biopsia, usando métodos bien conocidos por los expertos en técnicas médicas relacionadas.

"Metástasis ósea osteolítica" se refiere a un tipo de metástasis en la que se produce una resorción ósea (pérdida progresiva de la densidad ósea) en las inmediaciones de la metástasis que resulta de la estimulación de la actividad de los osteoclastos por las células tumorales y se caracteriza por dolor severo, fracturas patológicas, hipercalcemia, compresión de la médula espinal y otros síndromes resultantes de la compresión nerviosa.

Método para diseñar una terapia personalizada en pacientes con tumores de pulmón

Como se conoce en el estado de la técnica, el tratamiento que se administrará a un sujeto que padece cáncer depende de si este último es un tumor maligno, es decir, si tiene altas probabilidades de sufrir metástasis o si este último es un tumor benigno. En el primer supuesto, el tratamiento de elección es un tratamiento sistémico tal como quimioterapia y, en el segundo supuesto, el tratamiento de elección es un tratamiento localizado tal como radioterapia.

Por lo tanto, como se describe en la presente divulgación, dado que la sobreexpresión del gen c-MAF en células de cáncer de pulmón está relacionada con la presencia de metástasis, los niveles de expresión del gen c-MAF permiten tomar decisiones en términos de la terapia más adecuada para el sujeto que padece dicho cáncer.

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto con cáncer de pulmón, que comprende:

- (i) cuantificar la ganancia del número de copias de 16q22-24 en una muestra de tumor de dicho sujeto y
- (ii) comparar el número de copias obtenido previamente con el número de copias de dicha región en una muestra de control,

en el que si el número de copias de 16q22-24 ha crecido con respecto a la muestra de control, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia con el objetivo de prevenir y/o tratar la metástasis.

En otro aspecto se desvela un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto con cáncer de pulmón, que comprende

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

en el que si los niveles de expresión aumentan con respecto a los niveles de expresión de dicho gen en la muestra de control, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia con el objetivo de prevenir y/o tratar la metástasis. En un aspecto particular, al sujeto se le administra entonces al menos una terapia que previene, inhibe y/o trata la metástasis ósea, en la que si el nivel de expresión del gen c-MAF no aumenta con respecto a dicho valor de referencia, entonces dicho sujeto no es susceptible de recibir una terapia para prevenir la degradación ósea. En un aspecto particular de este método, al sujeto no se le administra entonces al menos una terapia que previene, inhibe y/o trata la metástasis ósea.

En una realización particular, la metástasis es una metástasis ósea. En una realización más preferida, la metástasis ósea es metástasis osteolítica.

Los términos y expresiones "sujeto", "cáncer de pulmón", "muestra de tumor", "metástasis", "determinación de los niveles de expresión", "gen c-MAF", "niveles de expresión aumentados" y "muestra de control" se han descrito en detalle en relación con el primer método desvelado y son igualmente aplicables al segundo método de la invención y al tercer método desvelado.

El tercer método desvelado comprende, en una primera etapa, cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tumor en un sujeto que padece cáncer de pulmón.

En un aspecto preferido, el tercer método desvelado comprende cuantificar solo el nivel de expresión del gen c-MAF como un marcador único, es decir, el método no implica determinar el nivel de expresión de ningún marcador

adicional.

En el caso del tercer método desvelado, la muestra es una muestra de tejido tumoral primario del sujeto. En una segunda etapa, el nivel de expresión del gen c-MAF obtenido en la muestra de tumor del sujeto se compara con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra de control. La determinación de los niveles de expresión del gen c-MAF debe estar relacionada con los valores de una muestra de control o una muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor a analizar, la naturaleza exacta de la muestra de control puede variar. Por tanto, preferentemente, la muestra de referencia es una muestra de tejido tumoral de un sujeto con cáncer de pulmón que no ha metastatizado o que corresponde al valor mediano de los niveles de expresión del gen c-MAF medidos en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de pulmón que no ha metastatizado.

En otro aspecto más, un nivel de expresión de c-MAF que está por encima del promedio indica un mayor riesgo de metástasis ósea, siendo el riesgo proporcional a los niveles de expresión de c-MAF. Por tanto, el riesgo de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de pulmón es dependiente de la dosis.

Una vez que los niveles de expresión del gen c-MAF en la muestra se han medido y comparado con la muestra control, si los niveles de expresión de dicho gen aumentan con respecto a sus niveles de expresión en la muestra control, entonces se puede concluir que dicho sujeto es susceptible de recibir terapia con el objetivo de prevenir (si el sujeto todavía tiene que experimentar metástasis) y/o tratar la metástasis (si el sujeto ya ha experimentado metástasis). Si no se observa dicho aumento de la expresión, al sujeto no se le administra al menos una terapia que previene, inhibe y/o trata la metástasis ósea.

Cuando el cáncer ha metastatizado, se usan tratamientos sistémicos que incluyen, aunque sin limitación, quimioterapia, tratamiento hormonal, inmunoterapia o una combinación de los mismos. Adicionalmente, se puede usar radioterapia y/o cirugía. La elección del tratamiento generalmente depende del tipo de cáncer primario, el tamaño, la ubicación de la metástasis, la edad, la salud general del paciente y los tipos de tratamientos usados anteriormente.

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

- La quimioterapia es el uso de medicamentos para destruir las células cancerosas. Los medicamentos se administran generalmente por vía oral o intravenosa. Algunas veces, la quimioterapia se usa junto con el tratamiento con radiación. Los tratamientos quimioterapéuticos adecuados para el cáncer de pulmón incluyen, sin limitación, antraciclinas (doxorubicina, epirrubicina, doxorubicina liposomal pegilada), taxanos (paclitaxel, docetaxel, paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina), 5-fluorouracilo (infusión continua de 5-FU, capecitabina), alcaloides (vinorelbina, vinblastina), gemcitabina, sales de platino (cisplatino, carboplatino), ciclofosfamida, etopósido y combinaciones de uno o más de los anteriores, tales como regímenes de ciclofosfamida/antraciclina +/- 5-fluorouracilo (tales como doxorubicina/ciclofosfamida (AC), epirrubicina/ciclofosfamida, (EC) ciclofosfamida/epirrubicina/5-fluorouracilo (CEF), ciclofosfamida/doxorubicina/5-fluorouracilo (CAF), 5-fluorouracilo/epirrubicina/ciclofosfamida (FEC)), ciclofosfamida/metotrexato/5 -fluorouracilo (CMF), antraciclinas/taxanos (tales como doxorubicina/paclitaxel o doxorubicina/docetaxel), docetaxel/capecitabina, gemcitabina/ paclitaxel, regímenes de taxano/platino (tales como paclitaxel/carboplatino o docetaxel/carboplatino).
- La terapia hormonal se basa en el hecho de que algunas hormonas promueven el crecimiento del cáncer. Por ejemplo, el estrógeno en las mujeres producido por los ovarios a veces promueve el crecimiento del cáncer de mama. Hay varias formas de detener la producción de estas hormonas. Una forma es extirpar los órganos que las producen: los ovarios en el caso de las mujeres, los testículos en el caso de los hombres. Con más frecuencia, se pueden usar medicamentos para evitar que estos órganos produzcan hormonas o para evitar que las hormonas actúen sobre las células cancerosas.
- La inmunoterapia es un tratamiento que ayuda al sistema inmunitario del paciente a combatir el cáncer. Existen varios tipos de inmunoterapia que se usan para tratar pacientes con metástasis. Estos incluyen, aunque sin limitación, citocinas, anticuerpos monoclonales y vacunas antitumorales.

En otro aspecto, El tratamiento es Alpharadin (dicloruro de radio-223). Alpharadin usa radiación alfa de la desintegración del radio-223 para destruir las células cancerosas. El radio-223 se auto-dirige naturalmente a metástasis óseas en virtud de sus propiedades como imitador del calcio. La radiación alfa tiene un alcance muy corto de 2-10 células (en comparación con la radioterapia actual que se basa en la radiación beta o gamma) y, por lo tanto, causa menos daño a los tejidos sanos circundantes (particularmente la médula ósea). Con propiedades similares al calcio, el radio-223 es atraído a lugares donde se usa el calcio para formar huesos en el cuerpo, incluyendo el sitio de crecimiento óseo anormal y más rápido - tal como el que se observa en las metástasis esqueléticas de hombres con cáncer de próstata avanzado, resistente a la castración. El radio-223, después de la inyección, es transportado en el torrente sanguíneo a sitios de crecimiento óseo anormal. El lugar donde un cáncer comienza en el cuerpo se conoce como el tumor primario. Algunas de estas células pueden desprenderse y ser transportadas en el torrente sanguíneo a otra parte del cuerpo. Las células cancerosas pueden asentarse en esa parte del cuerpo y formar un nuevo tumor. Si esto sucede, se llama cáncer secundario o metástasis. La mayoría de los pacientes con cáncer de próstata en estadio avanzado sufren la carga máxima de enfermedad en sus huesos. El

objetivo con el radio-223 es atacar selectivamente este cáncer secundario. Cualquier radio-223 no absorbido en los huesos se encamina rápidamente hacia el intestino y se excreta.

En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de mTor. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor es un inhibidor doble de mTor/PI3cinasa. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para prevenir o inhibir la metástasis. el inhibidor de mTor se selecciona del grupo que consiste en: ABI009 (sirolimús), rapamicina (sirolimús), Abraxane (paclitaxel), Absorb (everolimús), Afinitor (everolimús), Afinitor con Gleevec, AS703026 (pimasertib), Axxess (umirolimús), AZD2014, BEZ235, Biofreedom (umirolimús), BioMatrix (umirolimús), BioMatrix flex (umirolimús), CC115, CC223, Stent liberador de sirolimús biomanipulado Combo de ORBUSNEICH (sirolimús), Curaxin CBLC102 (mepacrina), DE109 (sirolimús), DS3078, Endeavour DES (zotarolimús), Endeavour Resolute (zotarolimús), Femara (letrozol), Hocena (antroquinonol), INK128, Inspiron (sirolimús), IPI504 (clorhidrato de retaspimicina), KRN951 (tivozanib), ME344, MGA031 (teplizumab), MiStent SES (sirolimús), MKC1, Nobori (umirolimús), OSI027, OV1123 (cordicepina), Palomid 529, PF04691502, Promus Element (everolimús), PWT33597, Rapamune (sirolimús), Resolute DES (zotarolimús), RG7422, SAR245409, SF1126, SGN75 (vorsetuzumab mafodotina), Synergy (everolimús), Taltorvic (ridaforolimús), Tarceva (erlotinib), Torisel (temsirolimús), Xience Prime (everolimús), Xience V (everolimús), Zomaxx (zotarolimús), Zortress (everolimús), Stent liberador de zotarolimús periférico de MEDTRONIC (zotarolimús), AP23841, AP24170, ARmTOR26, BN107, BN108, Canstatina GENZYME (canstatina), CU906, EC0371, EC0565, KI1004, LOR220, NV128, Rapamicina ONCOIMMUNE (sirolimús), SB2602, Sirolimús PNP SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS (sirolimús), TOP216, VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, Advacan (everolimús), AZD8055, Stent coronario liberador de sirolimús Cypher Select Plus de (sirolimús), Stent coronario liberador de sirolimús Cypher (sirolimús), Globo revestido de fármaco (sirolimús), E-Magic Plus (sirolimús), Emtor (sirolimús), Esprit (everolimús), Evertor (everolimús), HBF0079, LCP-Siro (sirolimús), Limus CLARIS (sirolimús), Inhibidor de mTOR CELLZOME, Stent coronario liberador de sirolimús Nevo (sirolimús), nPT-mTOR, Rapacan (sirolimús), Renacept (sirolimús), ReZolve (sirolimús), Rocas (sirolimús), SF1126, Sirolim (sirolimús), Sirolimús NORTH CHINA (sirolimús), Sirolimús RANBAXY (sirolimús), Sirolimús WATSON (sirolimús) Siropan (sirolimús), Sirova (sirolimús), Supralimus (sirolimús), Supralimus-Core (sirolimús), Tacrolimús WATSON (tacrolimús), Tafa93, Temsirolimús ACCORD (temsirolimús), Temsirolimús SANDOZ (temsirolimús), TOP216, Xience Prime (everolimús), Xience V (everolimús). En un aspecto específico, el inhibidor de mTor es Afinitor (everolimús)(http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&Novald=40294620643_38207963; última consulta el 28/11/2012). En otro aspecto, everolimús se combina con un inhibidor de la aromatasa. (Véase, por ejemplo, Baselga, J., *et al.*, Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. *N. Engl. J. Med.* 366(6): 520-529). En otro aspecto, los inhibidores de mTor pueden identificarse a través de métodos conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Zhou, H. *et al.* Updates of mTor inhibitors. 2010. *Anticancer Agents Med. Chem.* 10(7): 571-81). En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para tratar, prevenir o inhibir la metástasis en un paciente con cáncer de pulmón avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa en combinación con un segundo tratamiento. En algunos aspectos, el segundo tratamiento es cualquier tratamiento descrito en el presente documento.

En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de Src cinasa. En algunos aspectos, el inhibidor de Src se usa para prevenir o inhibir la metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de Src cinasa se selecciona del grupo: AZD0530 (saracatinib), Bosulif (bosutinib), ENMD981693, KD020, KX01, Sprycel (dasatinib), Yervoy (ipilimumab), AP23464, AP23485, AP23588, AZD0424, Inhibidor de c-Src cinasa KISSEI, CU201, KX2361, SKS927, SRN004, SUNK706, TG100435, TG100948, AP23451, Dasatinib HETERO (dasatinib), Dasatinib VALEANT (dasatinib), Fontrax (dasatinib), Inhibidor de Src cinasa KINEX, VX680,(lactato de tozasertib), XL228 y SUNK706. En algunos aspectos, el inhibidor de Src cinasa es dasatinib. En otro aspecto, los inhibidores de Src cinasa pueden identificarse a través de métodos conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, Sen, B. y Johnson, F.M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. 2011. *J. Signal Transduction.* 2011: 14 páginas). En algunos aspectos, El inhibidor de Src cinasa se usa para tratar, prevenir o inhibir la metástasis en un paciente que es positivo para la firma sensible a SRC (SRS). En algunos aspectos, el paciente es SRS+ y ER-. (Véase, por ejemplo, Zhang, CH.-F, *et al.* Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent survival signals. 2009. *Cancer Cell.* 16: 67-78). En algunos aspectos, el inhibidor de Src cinasa se usa para tratar, prevenir o inhibir la metástasis en un paciente con cáncer de pulmón avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de Src cinasa se usa en combinación con un segundo tratamiento. En algunos aspectos, el segundo tratamiento es cualquier tratamiento descrito en el presente documento.

En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de COX-2. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se usa para prevenir o inhibir la metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se selecciona del grupo: ABT963, Acetaminofeno ER JOHNSON (acetaminofeno), Acular X (ketorolaco trometamina), BAY1019036 (aspirina), BAY987111 (difenhidramina, naproxeno sódico), BAY11902 (piroxicam), BCIBUCH001 (ibuprofeno), Capoxigem (apricoxib), CS502, CS670 (pelubiprofeno), Diclofenaco HPBCD (diclofenaco), Diractin (ketoprofeno), GW406381, HCT1026 (nitroflurbiprofeno), Hyanalgese-D (diclofenaco), HydrocoDex (acetaminofeno, dextrometorfen, hidrocodona), Ibuprofeno sódico PFIZER (ibuprofeno sódico), Ibuprofeno con Acetaminofeno PFIZER (acetaminofeno, ibuprofeno), Impracor (ketoprofeno), IP880 (diclofenaco), IP940 (indometacina), ISV205 (diclofenaco sódico), JNS013 (acetaminofeno, clorhidrato de tramadol), Ketoprofeno TDS (ketoprofeno), LTNS001 (naproxeno etemesil), Mesalamina SALIX (mesalamina), Mesalamina SOFAR (mesalamina), Mesalazine (mesalamina), ML3000 (licofelona), MRX7EAT (etodolaco), Naproxeno IROKO (naproxeno), NCX4016 (nitroaspirina), NCX701 (nitroacetaminofeno), Nuprin SCOLR (ibuprofeno), OMS103HP (clorhidrato de amitriptilina, ketoprofeno, clorhidrato

de oximetazolina), Oralease (diclofenaco), OxycoDex (dextrometorfeno, oxicodona), P54, PercoDex (acetaminofeno, dextrometorfano, oxicodona), PL3100 (naproxeno, fopsfatidil colina), PSD508, R-Ketoprofeno (ketoprofeno), Remura (bromfenaco sódico), ROX828 (ketorolaco trometamina), RP19583 (ketoprofeno lisina), RQ00317076, SDX101 (R-etodolaco), TDS943 (diclofenaco sódico), TDT070 (ketoprofeno), TPR100, TQ1011 (ketoprofeno), TT063 (S-flurbiprofeno), UR8880 (cimicoxib), V0498TA01A (ibuprofeno), VT122 (etodolaco, propranolol), XP20B (acetaminofeno, dextropropoxifeno), XP21B (diclofenaco potásico), XP21L (diclofenaco potásico), Zoenasa (acetilcisteína, mesalamina), Acephen, Actifed Plus, Actifed-P, Acular, Acular LS, Acular PF, Acular X, Acuvail, Advil, Advil Allergy Sinus, Advil Cold and Sinus, Advil Congestion Relief, Advil PM, Advil PM Capsule, Air Salonpas, Airtal, Alcohol-Free NyQuil Cold & Flu Relief, Aleve, Aleve ABDI IBRAHIM, Aleve-D, Alka-Seltzer, Alka-Seltzer BAYER, Alka-Seltzer Extra Strength, Alka-Seltzer Lemon-Lime, Alka-Seltzer Original, Alka-Seltzer Plus, Alka-Seltzer plus Cold and Cough, Alka-Seltzer plus Cold and Cough Formula, Alka-Seltzer Plus Day and Night Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Day Non-Drowsy Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Flu Formula, Alka-Seltzer Plus Night Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Sinus Formula, Alka-Seltzer Plus Sparkling Original Cold Formula, Alka-Seltzer PM, Alka-Seltzer Wake-Up Call, Anacin, Anaprox, Anaprox MINERVA, Ansaid, Apitoxin, Apranax, Apranax abdi, Arcoxia, Arthritis Formula Bengay, Arthrotec, Asacol, Asacol HD, Asacol MEDUNA ARZNEIMITTEL, Asacol ORIFARM, Aspirina BAYER, Aspirina Complex, Aspirina Migran, AZD3582, Azulfidine, Baralgan M, BAY1019036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001, Benadryl Allergy, Benadryl Day and Night, Benylin 4 Flu, Benylin Cold and Flu, Benylin Cold and Flu Day and Night, Benylin Cold and Sinus Day and Night, Benylin Cold and Sinus Plus, Benylin Day and Night Cold and Flu Relief, Benylin1 All-In-One, Brexin, Brexin ANGELINI, Bromday, Bufferin, Buscopan Plus, Caldolor, Calmatel, Cambia, Canasa, Capoxigem, Cataflam, Celebrex, Celebrex ORIFARM, Advil Allergy Sinus infantil, Tylenol infantil, Tylenol Cough and Runny Nose infantil, Tylenol plus cold infantil, Tylenol plus Cold and Cough infantil, Tylenol plus cold and stuffy nose infantil, Tylenol plus Flu infantil, Tylenol plus cold & allergy infantil, Tylenol plus Cough & Runny Nose infantil, Tylenol plus Cough & Sore Throat infantil, Tylenol plus multi symptom cold infantil, Clinoril, Codral Cold and Flu, Codral Day and Night Day en comprimidos, Codral Day and Night Night en comprimidos, Codral Nighttime, Colazal, Combunox, Contac Cold plus Flu, Contac Cold plus Flu Non-Drowsy, Coricidin D, Coricidin HBP Cold and Flu, Coricidin HBP Day and Night Multi-Symptom Cold, Coricidin HBP Maximum Strength Flu, Coricidin HBP Nighttime Multi-Symptom Cold, Coricidin II Extra Strength Cold and Flu, CS502, CS670, Daypro, Daypro Alta, DDS06C, Demazin Cold and Flu, Demazin Cough, Cold and Flu, Demazin day/night Cold and Flu, Demazin PE Cold and Flu, Demazin PE day/night Cold and Flu, Diclofenac HPBCD, Dimetapp Day Relief, Dimetapp Multi-Symptom Cold and Flu, Dimetapp Night Relief, Dimetapp Pain and Fever Relief, Dimetapp PE Sinus Pain, Dimetapp PE Sinus Pain plus Allergy, Dipentum, Diractin, Disprin Cold 'n' Fever, Disprin Extra, Disprin Forte, Disprin Plus, Dristan Cold, Dristan Junior, Drixoral Plus, Duexis, Dynastat, Efferalgan, Efferalgan Plus Vitamina C, Efferalgan Vitamina C, Elixsure IB, Excedrin Back and Body, Excedrin Migraine, Excedrin PM, Excedrin Sinus Headache, Excedrin Tension Headache, Falcol, Fansamac, Feldene, FeverAll, Fiorinal, Fiorinal con Codeína, Flanax, Flector Patch, Flucam, Fortagesic, Gerbin, Glazio, Goody's Back and Body Pain, Goody's Cool Orange, Goody's Extra Strength, Goody's PM, Greaseless Bengay, GW406381, HCT1026, He Xing Yi, Hyanalgese-D, HydrocoDex, Ibuprofeno Sódico PFIZER, Ibuprofeno con, Acetaminofeno PFIZER, Icy Hot SANOFI AVENTIS, Impracor, Indocin, Indometacina APP PHARMA, Indometacina MYLAN, Tylenol para bebés, IP880, IP940, Iremod, ISV205, JNS013, Jr. Tylenol, Junifen, Junior Strength Advil, Junior Strength Motrin, Ketoprofeno TDS, Lemsip Max, Lemsip Max All in One, Lemsip Max All Night, Lemsip Max Cold and Flu, Lialda, Enjuague bucal Listerine, Crema Lloyds, Lodine, Lorfit P, Loxonin, LTNS001, Mersyndol, Mesalamina SALIX, Mesalamina SOFAR, Mesalazina, Mesasal GLAXO, Mesasal SANOFI, Mesulid, Metsal Heat Rub, Midol Complete, Midol Extended Relief, Midol Liquid Gels, Midol PM, Midol Teen Formula, Migranin COMPRIMIDOS REVESTIDOS, ML3000, Mobic, Mohrus, Motrin, Motrin Cold and Sinus Pain, Motrin PM, Movalis ASPEN, MRX7EAT, Nalfon, Nalfon PEDINOL, Naprelan, Naprosyn, Naprosyn RPG LIFE SCIENCE, Naproxeno IROKO, NCX4016, NCX701, NeoProfen LUNDBECK, Nevanac, Nexcede, Niflan, Norgesic MEDICIS, Novalgin, Nuprin SCOLR, Nurofen, Nurofen Cold and Flu, Nurofen Max Strength Migraine, Nurofen Plus, Nuromol, NyQuil con Vitamina C, Ocufer, OMS103HP, Oralease, Orudis ABBOTT JAPAN, Oruvail, Osteluc, OxycoDex, P54, Panadol, Panadol Actifast, Paradine, Paramax, Parfenac, Pedeia, Pennsaid, Pentasa, Pentasa ORIFARM, Peon, Percodan, Percodan-Demi, PercoDex, Percogesic, Perfalgan, PL2200, PL3100, Ponstel, Prexige, Prolensa, PSD508, R-Ketoprofeno, Rantudil, Relafen, Relafen, Remura, Robaxisal, Rotec, Rowasa, ROX828, RP19583, RQ00317076, Rubor, Salofalk, Salonpas, Saridon, SDX101, Seltouch, sfRowasa, Shinbaro, Sinumax, Sinutab, Sinutab, sinus, Spalt, Sprix, Strefen, Sudafed Cold and Cough, Sudafed Head Cold and Sinus, Sudafed PE Cold plus Cough, Sudafed PE Pressure plus Pain, Sudafed PE, Severe Cold, Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Day en comprimidos, Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Night en comprimidos, Sudafed PE Sinus plus Anti-inflammatory Pain Relief, Sudafed Sinus Advance, Surgam, Synalgos-DC, Synflex, Tavist allergy/sinus/headache, TDS943, TDT070, Theraflu Cold and Sore Throat, Theraflu Daytime Severe Cold and Cough, Theraflu Daytime Warming Relief, Theraflu Warming Relief Caplets Daytime Multi-Symptom Cold, Theraflu Warming Relief Cold and Chest Congestion, Thomapyrin, Thomapyrin C, Thomapyrin Efervescente, Thomapyrin Medium, Tilcotil, Tispol, Tolectin, Toradol, TPR100, TQ1011, Trauma-Salbe, Trauma-Salbe Kwizda, Treo, Treximet, Trovex, TT063, Tylenol, Tylenol Allergy Multi-Symptom, Tylenol Back Pain, Tylenol Cold & Cough Daytime, Tylenol Cold & Cough Nighttime, Tylenol Cold and Sinus Daytime, Tylenol Cold and Sinus Nighttime, Tylenol Cold Head Congestion Severe, Tylenol Cold Multi Symptom Daytime, Tylenol Cold Multi Symptom Nighttime Liquid, Tylenol Cold Multi Symptom Severe, Tylenol Cold Non-Drowsiness Formula, Tylenol Cold Severe Congestion Daytime, Tylenol Complete Cold, Cough and Flu Night time, Tylenol Flu Nighttime, Tylenol Menstrual, Tylenol PM, Tylenol Sinus Congestion & Pain Daytime, Tylenol Sinus Congestion & Pain Nighttime, Tylenol Sinus Congestion & Pain Severe, Tylenol Sinus Severe Congestion Daytime, Tylenol Ultra Relief, Tylenol con cafeína y fosfato de codeína,

- Tylenol con fosfato de codeína, Ultra Strength Bengay Cream, Ultracet, UR8880, V0498TA01A, Vicks NyQuil Cold and Flu Relief, Vicoprofen, Vimovo, Voltaren Emulgel, Voltaren GEL, Voltaren NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH, Voltaren XR, VT122, Xefo, Xefo Rapid, Xefocam, Xibrom, XL3, Xodol, XP20B, XP21B, XP21L, Zipsor, y Zoenasa. En otro aspecto, los inhibidores de COX-2 pueden identificarse a través de métodos conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, Dannhardt, G. y Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. 2001. *Eur. J. Med. Chem.* 36: 109-126). En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se usa para tratar, prevenir o inhibir la metástasis en un paciente con cáncer de pulmón avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se usa en combinación con un segundo tratamiento. En algunos aspectos, el segundo tratamiento es cualquier tratamiento descrito en el presente documento. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se usa en combinación con un segundo tratamiento seleccionado del grupo que consiste en: Denosumab, Zometa (http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&Novald=2935376934467633633; última consulta el 2/12/2012), Carbozantinib o Cabozantinib, Anticuerpo o péptido que bloquea la PTHLH (hormona similar a la hormona paratiroidea) o PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea).
- En otro aspecto, los agentes de tratamiento usados para evitar y/o prevenir la degradación ósea incluyen, aunque sin limitación:
- Inhibidores de la hormona paratiroidea (PTH) y hormona similar a la paratiroidea (PTHLH) (incluyendo los anticuerpos bloqueadores) o formas recombinantes de la misma (teriparatida correspondiente a los aminoácidos 7-34 de la PTH). Esta hormona actúa estimulando los osteoclastos y aumentando su actividad.
 - Ranelato de estroncio: es un tratamiento oral alternativo, y forma parte del grupo de fármacos llamados "agentes óseos de doble acción" (DABA) porque estimulan la proliferación de osteoblastos e inhiben la proliferación de osteoclastos.
 - "Moduladores de los receptores estrógenos" (SERM) se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de los estrógenos al receptor, Independientemente del mecanismo. Los ejemplos de los moduladores de los receptores de estrógenos incluyen, entre otros, estrógenos, progestágeno, estradiol, droloxifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, TSE-424, tamoxifeno, idoxifeno, L Y353381, LY117081, toremifeno, fluevestrant, 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-2H-1-benzopirán-3-il]-fenil-2,2-dimetilpropanoato 4,4'-dihidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenil-hidrazona y SH646.
 - Calcitonina: inhibe directamente la actividad de los osteoclastos a través del receptor de calcitonina. Los receptores de calcitonina se han identificado en la superficie de los osteoclastos.
 - Bifosfonatos: son un grupo de medicamentos usados para la prevención y el tratamiento de enfermedades con resorción y reabsorción ósea, tales como osteoporosis y cáncer con metástasis ósea, siendo este último con o sin hipercalcemia, asociadas al cáncer de mama y al cáncer de próstata. Los ejemplos de bifosfonatos que pueden usarse en la terapia diseñada por medio del tercer método desvelado incluyen, aunque sin limitación, bifosfonatos nitrogenados (tales como pamidronato, neridronato, olpadronato, alendronato, ibandronato, risedronato, incadronato, zoledronato o ácido zoledrónico, etc.) y bisfosfonatos no nitrogenados (tales como etidronato, clodronato, tiludronato, etc.).
 - "Inhibidores de catepsina K" se refiere a compuestos que interfieren en la actividad de la cisteína proteasa catepsina K. Los ejemplos no limitantes de los inhibidores de catepsina K incluyen los derivados de 4-amino-pirimidina-2-carbonitrilo (descritos en la solicitud de patente internacional WO 03/020278 bajo el nombre de Novartis Pharma GMBH), pirrolo-pirimidinas descritas en la publicación WO 03/020721 (Novartis Pharma GMBH) y la publicación WO 04/000843 (ASTRAZENECA AB), así como los inhibidores descritos en las publicaciones PCT WO 00/55126 de Axys Pharmaceuticals, WO 01/49288 de Merck Frosst Canada & Co. y Axys Pharmaceuticals.
 - "Inhibidor de DKK-1 (Dickkopf-1)", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que es capaz de reducir la actividad de DKK-1. DKK-1 es un antagonista de la ruta de Wnt soluble expresado predominantemente en hueso adulto y regulado positivamente en pacientes con mieloma con lesiones osteolíticas. Los agentes dirigidos a DKK-1 pueden jugar un papel en la prevención de la enfermedad ósea osteolítica en pacientes con mieloma múltiple. BHQ880 de Novartis es un anticuerpo neutralizante anti-DKK-1, completamente humano, de primera clase. Los estudios preclínicos apoyan la hipótesis de que BHQ880 promueve la formación de hueso y, por lo tanto, inhibe la enfermedad osteolítica inducida por tumores (Ettenberg S. et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting. 12-16 de abril de 2008; San Diego, Calif. Resumen).
 - "Inhibidor doble de MET y VEGFR2", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que sea un potente inhibidor doble de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape de tumores impulsado por MET. MET se expresa no solo en células tumorales y endoteliales, sino también en osteoblastos (células formadoras de hueso) y osteoclastos (células eliminadoras de hueso). HGF se une a MET en todos estos tipos de células, lo que otorga a la ruta de MET un papel importante en múltiples bucles autocrinos y paracrinos. La activación de MET en células tumorales parece ser importante en el establecimiento de lesiones óseas metastásicas. Al mismo tiempo, la activación de la ruta de MET en los osteoblastos y los osteoclastos puede conducir a características patológicas de las metástasis óseas, incluyendo el crecimiento (es decir, lesiones blásticas) o destrucción (es decir, lesión lítica) óseos anómalos. Por tanto, dirigirse a la ruta de MET puede ser una estrategia viable para prevenir el establecimiento y la progresión de las lesiones óseas metastásicas. Cabozantinib (Exelixis, Inc), anteriormente conocido como XL184 (CAS 849217-68-1), es un potente inhibidor doble de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape de tumores impulsado por

MET. En estudios preclínicos múltiples, se ha demostrado que cabozantinib destruye las células tumorales, reduce las metástasis e inhibe la angiogénesis (la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para apoyar el crecimiento del tumor). Otros inhibidores dobles adecuados son E7050 (N-[2-Fluoro-4-((2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonilaminopiridin-4-il)oxi)fenil]-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida(2R,3R)-tartrato) (CAS 928037-13-2) o Foretinib (también conocido como GSK1363089, XL880, CAS 849217-64-7).

- "Inhibidores de RANKL", como se usa en este documento, se refieren a cualquier compuesto que sea capaz de reducir la actividad de RANK. RANKL se encuentra en la superficie de la membrana de osteoblastos del estroma y las células de linfocitos T, y estas células de linfocitos T son las únicas que han demostrado la capacidad de secretarlo. Su función principal es la activación de los osteoclastos, células implicadas en la resorción ósea. Los inhibidores de RANKL pueden actuar bloqueando la unión de RANKL a su receptor (RANK), bloqueando la señalización mediada por RANK o reduciendo la expresión de RANKL bloqueando la transcripción o la traducción de RANKL. Los antagonistas o inhibidores de RANKL adecuados para uso en la presente divulgación incluyen, sin limitación:

- o una proteína RANK adecuada que es capaz de unirse a RANKL y que comprende la totalidad o un fragmento del dominio extracelular de una proteína RANK. La RANK soluble puede comprender el péptido señal y el dominio extracelular de los polipéptidos RANK humanos o murinos, o como alternativa, se puede usar la forma madura de la proteína con el péptido señal eliminado.

- o Osteoprotegerina o una variante de la misma con capacidad de unión a RANKL,

- o moléculas antisentido específicas de RANKL

- o Ribozimas capaces de procesar los productos transcritos de RANKL

- o Anticuerpos anti-RANKL específicos. "Anticuerpo anti-RANKL o anticuerpo dirigido contra RANKL" se entiende en el presente documento como todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse específicamente al ligando del receptor activador para el factor nuclear kB (RANKL) que inhibe una o más funciones de RANKL. Los anticuerpos pueden prepararse usando cualquiera de los métodos que son conocidos por el experto en la materia. Por tanto, los anticuerpos policlonales se preparan por medio de la inmunización de un animal con la proteína a inhibir. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Kohler, Milstein *et al.* (Nature, 1975, 256:495). Los anticuerpos adecuados en el contexto de la presente divulgación incluyen anticuerpos intactos que comprenden una región de unión a antígeno variable y una región constante, fragmentos "Fab", "F(ab')₂" y "Fab", Fv, scFv, diacuerpos y anticuerpos biespecíficos.

- o Nanocuerpos anti-RANKL específicos. Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada de origen natural. La tecnología de Nanocuerpo se desarrolló originalmente después del descubrimiento de que los camélidos (camellos y llamas) poseen anticuerpos completamente funcionales que carecen de cadenas ligeras. La estructura general de los nanocuerpos es FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 en la que FR1 a FR4 son las regiones marco 1 a 4 CDR1 a CDR3 son las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). De manera importante, el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga la capacidad completa de unión a antígeno del anticuerpo de cadena pesada original. Estos nuevos dominios VHH descubiertos con sus propiedades estructurales y funcionales únicas forman la base de una nueva generación de anticuerpos terapéuticos que Ablynx ha llamado Nanocuerpos.

En un aspecto, el inhibidor de RANKL se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo específico de RANKL, un nanocuerpo específico de RANKL y osteoprotegerina. En un aspecto específico, el anticuerpo anti-RANKL es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo anti-RANKL es Denosumab (Pageau, Steven C. (2009). *mAbs* 1 (3): 210-215, número CAS 615258-40-7). Denosumab es un anticuerpo monoclonal completamente humano que se une a RANKL y evita su activación (no se une al receptor RANK). Diversos aspectos de Denosumab están cubiertos por las patentes de Estados Unidos N° 6.740.522; 7.411.050; 7.097.834; 7.364.736. En otro aspecto, el inhibidor de RANKL es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o construcción de fusión que se une al mismo epítipo que Denosumab.

En un aspecto preferido, el nanocuerpo anti-RANKL es cualquiera de los nanocuerpos como se describen en el documento WO2008142164. En un aspecto todavía más preferido, el anticuerpo anti-RANKL es el ALX-0141 (Ablynx). ALX-0141 ha sido diseñado para inhibir la pérdida ósea asociada con osteoporosis postmenopáusica, artritis reumatoide, cáncer y ciertos medicamentos, y para restablecer el equilibrio del metabolismo óseo sano.

En un aspecto preferido, el agente que previene la degradación ósea se selecciona del grupo que consiste en un bifosfonato, un inhibidor de RANKL, un inhibidor de PTH y PTHLH o un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor doble de MET y VEGFR2, Radio-223, calcitonina y un inhibidor de catepsina K. En un aspecto más preferido, el agente que previene la degradación ósea es un bifosfonato. En un aspecto aún más preferido, el bifosfonato es el ácido zoledrónico.

En una realización, se administra un antagonista de CCR5 para prevenir o inhibir la metástasis del tumor de cáncer de pulmón primario al hueso. En una realización, el antagonista de CCR5 es una molécula grande. En otra

realización, el antagonista de CCR5 es una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el antagonista de CCR5 es Maraviroc (Velasco-Velázquez, M. *et al.* 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 72:3839-3850.). En algunas realizaciones, el antagonista de CCR5 es Vicriviroc. Velasco-Velázquez, M. *et al.* 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 72:3839-3850.). En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es Aplaviroc (Demarest J.F. *et al.* 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. *Retrovirology* 2(Supl. 1): S13). En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es un antagonista de CCR5 espiropiperidina. (Rotstein D.M. *et al.* 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19 (18): 5401-5406. En algunas realizaciones, el antagonista de CCR5 es INCB009471 (Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 4(2): 82-7).

En un aspecto preferido, el inhibidor doble de MET y VEGFR2 se selecciona del grupo que consiste en Cabozantinib, Foretinib y E7050.

15 En una realización preferida, la terapia con Radio 223 es alfaradin.

Como alternativa, se puede llevar a cabo un tratamiento combinado en el que más de un agente de los mencionados anteriormente se combinan para tratar y/o prevenir la metástasis o dichos agentes se pueden combinar con otros suplementos, tales como calcio o vitamina D o con un tratamiento hormonal.

20 Método para diseñar una terapia personalizada en pacientes con cáncer de pulmón con metástasis ósea

Los pacientes que padecen cáncer de pulmón que ya ha metastatizado al hueso y en los que hay niveles elevados de c-MAF pueden beneficiarse particularmente de terapias con el objetivo de prevenir la degradación ósea causada por el aumento de la actividad osteoclástica.

Por tanto, en otro aspecto, se desvela un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto con cáncer de pulmón con metástasis ósea (en lo sucesivo, el cuarto método desvelado), que comprende

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

35 en el que si los niveles de expresión aumentan con respecto a los niveles de expresión de dicho gen en la muestra de control, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia con el objetivo de prevenir la degradación ósea.

en la que si el nivel de expresión no aumenta con respecto a dicho valor de referencia, entonces dicho sujeto no es susceptible de recibir una terapia con el objetivo de prevenir y/o tratar la metástasis ósea.

40 Los términos y expresiones "sujeto", "cáncer de pulmón", "muestra de tumor", "metástasis", "determinación de los niveles de expresión", "gen c-MAF", "niveles de expresión aumentados" y "muestra de control" se han descrito en detalle en relación con el primer método desvelado y son igualmente aplicables al segundo y al cuarto método desvelado.

45 En un aspecto preferido, la metástasis ósea es metástasis osteolítica.

El cuarto método desvelado comprende, en una primera etapa, cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tumor en un sujeto que padece cáncer de pulmón. En el caso del cuarto método desvelado, la muestra es una muestra de tejido de metástasis ósea.

55 En un aspecto preferido, el cuarto método desvelado comprende cuantificar solo el nivel de expresión del gen c-MAF como un marcador único, es decir, el método no implica determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional.

60 En una segunda etapa, el nivel de expresión del gen c-MAF obtenido en la muestra de tumor del sujeto se compara con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra de control. La determinación de los niveles de expresión del gen c-MAF debe correlacionarse con los valores de una muestra de control o una muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor a analizar, la naturaleza exacta de la muestra de control puede variar. Por tanto, en el caso que implica el cuarto método desvelado, entonces la muestra de referencia es una muestra de tejido tumoral de un sujeto con cáncer de pulmón que no ha experimentado metástasis o que corresponde al valor mediano de los niveles de expresión del gen c-MAF medidos en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de pulmón que no han experimentado metástasis.

65 Una vez que el nivel de expresión del gen c-MAF en la muestra se ha medido y comparado con la muestra control, si los niveles de expresión de dicho gen aumentan con respecto a su nivel de expresión en la muestra de control,

entonces se puede concluir que dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia con el objetivo de evitar o prevenir la degradación ósea.

Como se usa en el presente documento, un "agente para evitar o prevenir la degradación ósea" se refiere a cualquier molécula capaz de tratar o detener la degradación ósea, ya sea estimulando la proliferación de osteoblastos o inhibiendo la proliferación de osteoclastos.

Los ejemplos ilustrativos de agentes usados para evitar y/o prevenir la degradación ósea y/o la metástasis ósea incluyen, aunque sin limitación:

- Hormona paratiroidea (PTH) o formas recombinantes de la misma (teriparatida correspondiente a los aminoácidos 1-34 de la PTH). Esta hormona actúa estimulando los osteoblastos y aumentando su actividad.
- Ranelato de estroncio: es un tratamiento oral alternativo, y forma parte del grupo de fármacos llamados "agentes óseos de doble acción" (DABA) porque estimulan la proliferación de osteoblastos e inhiben la proliferación de osteoclastos.
- "Moduladores de los receptores estrógenos" (SERM) se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de los estrógenos al receptor, Independientemente del mecanismo. Los ejemplos de los moduladores de los receptores de estrógenos incluyen, entre otros, estrógenos, progestágeno, estradiol, droloxifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, TSE-424, tamoxifeno, idoxifeno, L Y353381, LY117081, toremifeno, fluevestrant, 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-2H-1-benzopirán-3-il]-fenil-2,2-dimetilpropanoato 4,4'-dihidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenil-hidrazona y SH646.
- Calcitonina: inhibe directamente la actividad de los osteoclastos a través del receptor de calcitonina. Los receptores de calcitonina se han identificado en la superficie de los osteoclastos.
- Bifosfonatos: son un grupo de medicamentos usados para la prevención y el tratamiento de enfermedades con resorción y reabsorción ósea, tales como osteoporosis y cáncer con metástasis ósea, siendo este último con o sin hipercalcemia, asociadas al cáncer de mama y al cáncer de próstata. Los ejemplos de bifosfonatos que pueden usarse en la terapia diseñada por medio del cuarto método desvelado incluyen, aunque sin limitación, bifosfonatos nitrogenados (tales como pamidronato, neridronato, olpadronato, alendronato, ibandronato, risedronato, incadronato, zoledronato o ácido zoledrónico, etc.) y bisfosfonatos no nitrogenados (tales como etidronato, clodronato, tiludronato, etc.).
- "Inhibidores de catepsina K" se refiere a compuestos que interfieren en la actividad de la cisteína proteasa catepsina K. Los ejemplos no limitantes de los inhibidores de catepsina K incluyen los derivados de 4-amino-pirimidina-2-carbonitrilo (descritos en la solicitud de patente internacional WO 03/020278 bajo el nombre de Novartis Pharma GmbH), pirrolo-pirimidinas descritas en la publicación WO 03/020721 (Novartis Pharma GmbH) y la publicación WO 04/000843 (ASTRAZENECA AB), así como los inhibidores descritos en las publicaciones PCT WO 00/55126 de Axys Pharmaceuticals, WO 01/49288 de Merck Frosst Canada & Co. y Axys Pharmaceuticals.
- "Inhibidor de DKK-1 (Dickkopf-1)", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que es capaz de reducir la actividad de DKK-1. DKK-1 es un antagonista de la ruta de Wnt soluble expresado predominantemente en hueso adulto y regulado positivamente en pacientes con mieloma con lesiones osteolíticas. Los agentes dirigidos a DKK-1 pueden jugar un papel en la prevención de la enfermedad ósea osteolítica en pacientes con mieloma múltiple. BHQ880 de Novartis es un anticuerpo neutralizante anti-DKK-1, completamente humano, de primera clase. Los estudios preclínicos apoyan la hipótesis de que BHQ880 promueve la formación de hueso y, por lo tanto, inhibe la enfermedad osteolítica inducida por tumores (Ettenberg S. et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting. 12-16 de abril de 2008; San Diego, Calif. Resumen).
- "Inhibidor doble de MET y VEGFR2", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que sea un potente inhibidor doble de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape de tumores impulsado por MET. MET se expresa no solo en células tumorales y endoteliales, sino también en osteoblastos (células formadoras de hueso) y osteoclastos (células eliminadoras de hueso). HGF se une a MET en todos estos tipos de células, lo que otorga a la ruta de MET un papel importante en múltiples bucles autocrinos y paracrinos. La activación de MET en células tumorales parece ser importante en el establecimiento de lesiones óseas metastásicas. Al mismo tiempo, la activación de la ruta de MET en los osteoblastos y los osteoclastos puede conducir a características patológicas de las metástasis óseas, incluyendo el crecimiento (es decir, lesiones blásticas) o destrucción (es decir, lesión lítica) óseos anómalos. Por tanto, dirigirse a la ruta de MET puede ser una estrategia viable para prevenir el establecimiento y la progresión de las lesiones óseas metastásicas. Cabozantinib (Exelixis, Inc), anteriormente conocido como XL184 (CAS 849217-68-1), es un potente inhibidor doble de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape de tumores impulsado por MET. En estudios preclínicos múltiples, se ha demostrado que cabozantinib destruye las células tumorales, reduce las metástasis e inhibe la angiogénesis (la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para apoyar el crecimiento del tumor). Otros inhibidores dobles adecuados son E7050 (N-[2-Fluoro-4-((2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)]piperidin-1-il)]carbonilaminopiridin-4-il)oxi]fenil]-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida(2R,3R)-tartrato) (CAS 928037-13-2) o Foretinib (también conocido como GSK1363089, XL880, CAS 849217-64-7).
- "Inhibidores de RANKL", como se usa en este documento, se refiere a cualquier compuesto que sea capaz de reducir la actividad de RANK. RANKL se encuentra en la superficie de la membrana de osteoblastos del estroma

y las células de linfocitos T, y estas células de linfocitos T son las únicas que han demostrado la capacidad de secretarlo. Su función principal es la activación de los osteoclastos, células implicadas en la resorción ósea. Los inhibidores de RANKL pueden actuar bloqueando la unión de RANKL a su receptor (RANK), bloqueando la señalización mediada por RANK o reduciendo la expresión de RANKL bloqueando la transcripción o la traducción de RANKL. Los antagonistas o inhibidores de RANKL adecuados para uso en la presente divulgación incluyen, sin limitación:

○ una proteína RANK adecuada que es capaz de unirse a RANKL y que comprende la totalidad o un fragmento del dominio extracelular de una proteína RANK. La RANK soluble puede comprender el péptido señal y el dominio extracelular de los polipéptidos RANK humanos o murinos, o como alternativa, se puede usar la forma madura de la proteína con el péptido señal eliminado.

○ Osteoprotegerina o una variante de la misma con capacidad de unión a RANKL, ○ moléculas antisentido específicas de RANKL

○ Ribozimas capaces de procesar los productos transcritos de RANKL.

○ Anticuerpos anti-RANKL específicos. "Anticuerpo anti-RANKL o anticuerpo dirigido contra RANKL" se entiende en el presente documento como todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse específicamente al ligando del receptor activador para el factor nuclear **κB** (RANKL) que inhibe una o más funciones de RANKL. Los anticuerpos pueden prepararse usando cualquiera de los métodos que son conocidos por el experto en la materia. Por tanto, los anticuerpos policlonales se preparan por medio de la inmunización de un animal con la proteína a inhibir. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Kohler, Milstein *et al.* (Nature, 1975, 256:495). Los anticuerpos adecuados en el contexto de la presente divulgación incluyen anticuerpos intactos que comprenden una región de unión a antígeno variable y una región constante, fragmentos "Fab", "F(ab')₂" y "Fab", Fv, scFv, diacuerpos y anticuerpos biespecíficos.

○ Nanocuerpos anti-RANKL específicos. Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada de origen natural. La tecnología de Nanocuerpo se desarrolló originalmente después del descubrimiento de que los camélidos (camellos y llamas) poseen anticuerpos completamente funcionales que carecen de cadenas ligeras. La estructura general de los nanocuerpos es

FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 en la que FR1 a FR4 son las regiones marco 1 a 4 CDR1 a CDR3 son las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). De manera importante, el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga la capacidad completa de unión a antígeno del anticuerpo de cadena pesada original. Estos nuevos dominios VHH descubiertos con sus propiedades estructurales y funcionales únicas forman la base de una nueva generación de anticuerpos terapéuticos que Ablynx ha llamado Nanocuerpos.

En un aspecto, el inhibidor de RANKL se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo específico de RANKL, un nanocuerpo específico de RANKL y osteoprotegerina. En un aspecto preferido, el anticuerpo anti-RANKL es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto aún más preferido, el anticuerpo anti-RANKL es Denosumab (Pageau, Steven C. (2009). *mAbs* 1 (3): 210-215, número CAS 615258-40-7). En el contexto de la presente divulgación, Denosumab es un anticuerpo monoclonal que se une a RANKL y evita su activación (no se une al receptor RANK). Diversos aspectos de Denosumab están cubiertos por las patentes de Estados Unidos N° 6.740.522; 7.411.050; 7.097.834; 7.364.736. En otro aspecto, el inhibidor de RANKL es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o construcción de fusión que se une al mismo epítipo que Denosumab.

En un aspecto preferido, el nanocuerpo anti-RANKL es cualquiera de los nanocuerpos como se describen en el documento WO2008142164. En un aspecto todavía más preferido, el anticuerpo anti-RANKL es el ALX-0141 (Ablynx). ALX-0141 ha sido diseñado para inhibir la pérdida ósea asociada con osteoporosis postmenopáusica, artritis reumatoide, cáncer y ciertos medicamentos, y para restablecer el equilibrio del metabolismo óseo sano.

En un aspecto preferido, el agente que previene la degradación ósea se selecciona del grupo que consiste en un bifosfonato, un inhibidor de RANKL, un inhibidor de PTH y PTHLH o un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor doble de MET y VEGFR2, un moduladores de los receptores de estrógenos, Radio-223, calcitonina y un inhibidor de catepsina K. En un aspecto más preferido, el agente que previene la degradación ósea es un bifosfonato. En un aspecto aún más preferido, el bifosfonato es el ácido zoledrónico.

En un aspecto, se administra un antagonista de CCR5 para prevenir o inhibir la metástasis del tumor de cáncer de pulmón primario al hueso. En un aspecto, el antagonista de CCR5 es una molécula grande. En otro aspecto, el antagonista de CCR5 es una molécula pequeña. En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es Maraviroc (Velasco-Velázquez, M. *et al.* 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 72:3839-3850.). En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es Vicriviroc. Velasco-Velázquez, M. *et al.* 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 72:3839-3850.). En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es Aplaviroc (Demarest J.F. *et al.* 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. *Retrovirology* 2(Supl. 1): S13). En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es un antagonista de CCR5 espiropiperidina. (Rotstein D.M. *et al.* 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. *Bioorganic &*

Medicinal Chemistry Letters. 19 (18): 5401-5406. En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es INCB009471 (Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. Curr. Opin. HIV AIDS. 4(2): 82-7).

5 En un aspecto preferido, el inhibidor doble de MET y VEGFR2 se selecciona del grupo que consiste en Cabozantinib, Foretinib y E7050.

En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de mTor. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor es un inhibidor doble de mTor/PI3cinasa. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para prevenir o inhibir la metástasis. el inhibidor de mTor se selecciona del grupo que consiste en: ABI009 (sirolimús), rapamicina (sirolimús), Abraxane (paclitaxel), Absorb (everolimús), Afinitor (everolimús), Afinitor con Gleevec, AS703026 (pimasertib), Axxess (umirolimús), AZD2014, BEZ235, Biofreedom (umirolimús), BioMatrix (umirolimús), BioMatrix flex (umirolimús), CC115, CC223, Stent liberador de sirolimús biomanipulado Combo de ORBUSNEICH (sirolimús), Curaxin CBLC102 (mepacrina), DE109 (sirolimús), DS3078, Endeavour DES (zotarolimús), Endeavour Resolute (zotarolimús), Femara (letrozol), Hocena (antroquinonol), INK128, Inspiron (sirolimús), IPI504 (clorhidrato de retaspimicina), KRN951 (tivozanib), ME344, MGA031 (teplizumab), MiStent SES (sirolimús), MKC1, Nobori (umirolimús), OSI027, OVI123 (cordicepina), Palomid 529, PF04691502, Promus Element (everolimús), PWT33597, Rapamune (sirolimús), Resolute DES (zotarolimús), RG7422, SAR245409, SF1126, SGN75 (vorsetuzumab mafodotina), Synergy (everolimús), Taltorvic (ridaforolimús), Tarceva (erlotinib), Torisel (temsirolimús), Xience Prime (everolimús), Xience V (everolimús), Zomaxx (zotarolimús), Zortress (everolimús), Stent liberador de zotarolimús periférico de MEDTRONIC (zotarolimús), AP23841, AP24170, ARmTOR26, BN107, BN108, Canstatina GENZYME (canstatina), CU906, EC0371, EC0565, KI1004, LOR220, NV128, Rapamicina ONCOIMMUNE (sirolimús), SB2602, Sirolimús PNP SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS (sirolimús), TOP216, VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, Advacan (everolimús), AZD8055, Stent coronario liberador de sirolimús Cypher Select Plus de (sirolimús), Stent coronario liberador de sirolimús Cypher (sirolimús), Globo revestido de fármaco (sirolimús), E-Magic Plus (sirolimús), Emtor (sirolimús), Esprit (everolimús), Evertor (everolimús), HBF0079, LCP-Siro (sirolimús), Limus CLARIS (sirolimús), Inhibidor de mTOR CELLZOME, Stent coronario liberador de sirolimús Nevo (sirolimús), nPT-mTOR, Rapacan (sirolimús), Renacept (sirolimús), ReZolve (sirolimús), Rocas (sirolimús), SF1126, Sirolim (sirolimús), Sirolimús NORTH CHINA (sirolimús), Sirolimús RANBAXY (sirolimús), Sirolimús WATSON (sirolimús) Siropan (sirolimús), Sirova (sirolimús), Supralimus (sirolimús), Supralimus-Core (sirolimús), Tacrolimús WATSON (tacrolimús), TAF A93, Temsirolimús ACCORD (temsirolimús), Temsirolimús SANDOZ (temsirolimús), TOP216, Xience Prime (everolimús), Xience V (everolimús). En un aspecto específico, el inhibidor de mTor es Afinitor (everolimús)(http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&Novald=40294620643_38207963; última consulta el 28/11/2012). En otro aspecto, los inhibidores de mTor pueden identificarse a través de métodos conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Zhou, H. et al. Updates of mTor inhibitors. 2010. Anticancer Agents Med. Chem. 10(7): 571-81). En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para tratar, prevenir o inhibir la metástasis en un paciente con cáncer de pulmón avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa en combinación con un segundo tratamiento. En algunos aspectos, el segundo tratamiento es cualquier tratamiento descrito en el presente documento.

40 En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de Src cinasa. En algunos aspectos, el inhibidor de Src se usa para prevenir o inhibir la metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de Src cinasa se selecciona del grupo: AZD0530 (saracatinib), Bosulif (bosutinib), ENMD981693, KD020, KX01, Sprycel (dasatinib), Yervoy (ipilimumab), AP23464, AP23485, AP23588, AZD0424, Inhibidor de c-Src cinasa KISSEI, CU201, KX2361, SKS927, SRN004, SUNK706, TG100435, TG100948, AP23451, Dasatinib HETERO (dasatinib), Dasatinib VALEANT (dasatinib), Fontrax (dasatinib), Inhibidor de Src cinasa KINEX, VX680,(lactato de tozasertib), XL228 y SUNK706. En algún aspecto, el inhibidor de Src cinasa es dasatinib. En otro aspecto, los inhibidores de Src cinasa pueden identificarse a través de métodos conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, Sen, B. y Johnson, F.M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. 2011. *J. Signal Transduction*. 2011: 14 páginas). En algunos aspectos, El inhibidor de Src cinasa se usa para tratar, prevenir o inhibir la metástasis en un paciente que es positivo para la firma sensible a SRC (SRS). En algunos aspectos, el paciente es SRS+. (Véase, por ejemplo, Zhang, CH.-F, et al. Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent survival signals. 2009. *Cancer Cell*. 16: 67-78). En algunos aspectos, el inhibidor de Src cinasa se usa para tratar, prevenir o inhibir la metástasis en un paciente con cáncer de pulmón avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de Src cinasa se usa en combinación con un segundo tratamiento. En algunos aspectos, el segundo tratamiento es cualquier tratamiento descrito en el presente documento.

55 En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de COX-2. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se usa para prevenir o inhibir la metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se selecciona del grupo: ABT963, Acetaminofeno ER JOHNSON (acetaminofeno), Acular X (ketorolaco trometamina), BAY1019036 (aspirina), BAY987111 (difenhidramina, naproxeno sódico), BAY11902 (piroxicam), BCIBUCH001 (ibuprofeno), Capoxigem (apricoxib), CS502, CS670 (pelubiprofeno), Diclofenaco HPBCD (diclofenaco), Diractin (ketoprofeno), GW406381, HCT1026 (nitrofuribuprofeno), Hyanalgese-D (diclofenaco), HydrocoDex (acetaminofeno, dextrometorfen, hidrocodona), Ibuprofeno sódico PFIZER (ibuprofeno sódico), Ibuprofeno con Acetaminofeno PFIZER (acetaminofeno, ibuprofeno), Impracor (ketoprofeno), IP880 (diclofenaco), IP940 (indometacina), ISV205 (diclofenaco sódico), JNS013 (acetaminofeno, clorhidrato de tramadol), Ketoprofeno TDS (ketoprofeno), LTNS001 (naproxeno etemesil), Mesalamina SALIX (mesalamina), Mesalamina SOFAR (mesalamina), Mesalazine (mesalamina), ML3000 (licofelona), MRX7EAT (etodolaco), Naproxeno IROKO (naproxeno), NCX4016 (nitroaspirina), NCX701

(nitroacetaminofeno), Nuprin SCOLR (ibuprofeno), OMS103HP (clorhidrato de amitriptilina, ketoprofeno, clorhidrato de oximetazolina), Oralease (diclofenaco), Oxycodex (dextrometorfeno, oxicodona), P54, PercoDex (acetaminofeno, dextrometorfano, oxicodona), PL3100 (naproxeno, fopsfatidil colina), PSD508, R-Ketoprofeno (ketoprofeno), Remura (bromfenaco sódico), ROX828 (ketorolaco trometamina), RP19583 (ketoprofeno lisina), RQ00317076, SDX101 (R-etodolaco), TDS943 (diclofenaco sódico), TDT070 (ketoprofeno), TPR100, TQ1011 (ketoprofeno), TT063 (S-flurbiprofeno), UR8880 (cimicoxib), V0498TA01A (ibuprofeno), VT122 (etodolaco, propranolol), XP20B (acetaminofeno, dextropropoxifeno), XP21B (diclofenaco potásico), XP21L (diclofenaco potásico), Zoenasa (acetilcisteina, mesalamina), Acephen, Actifed Plus, Actifed-P, Acular, Acular LS, Acular PF, Acular X, Acuvail, Advil, Advil Allergy Sinus, Advil Cold and Sinus, Advil Congestion Relief, Advil PM, Advil PM Capsule, Air Salonpas, Airtal, Alcohol-Free NyQuil Cold & Flu Relief, Aleve, Aleve ABDI IBRAHIM, Aleve-D, Alka-Seltzer, Alka-Seltzer BAYER, Alka-Seltzer Extra Strength, Alka-Seltzer Lemon-Lime, Alka-Seltzer Original, Alka-Seltzer Plus, Alka-Seltzer plus Cold and Cough, Alka-Seltzer plus Cold and Cough Formula, Alka-Seltzer Plus Day and Night Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Day Non-Drowsy Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Flu Formula, Alka-Seltzer Plus Night Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Sinus Formula, Alka-Seltzer Plus Sparkling Original Cold Formula, Alka-Seltzer PM, Alka-Seltzer Wake-Up Call, Anacin, Anaprox, Anaprox MINERVA, Ansaid, Apitoxin, Apranax, Apranax abdi, Arcoxia, Arthritis Formula Bengay, Arthrotec, Asacol, Asacol HD, Asacol MEDUNA ARZNEIMITTEL, Asacol ORIFARM, Aspirina BAYER, Aspirina Complex, Aspirina Migran, AZD3582, Azulfidine, Baralgan M, BAY1019036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001, Benadryl Allergy, Benadryl Day and Night, Benylin 4 Flu, Benylin Cold and Flu, Benylin Cold and Flu Day and Night, Benylin Cold and Sinus Day and Night, Benylin Cold and Sinus Plus, Benylin Day and Night Cold and Flu Relief, Benylin1 All-In-One, Brexin, Brexin ANGELINI, Bromday, Bufferin, Buscopan Plus, Caldolor, Calmatel, Cambia, Canasa, Capoxigem, Cataflam, Celebrex, Celebrex ORIFARM, Advil Allergy Sinus infantil, Tylenol infantil, Tylenol Cough and Runny Nose infantil, Tylenol plus cold infantil, Tylenol plus Cold and Cough infantil, Tylenol plus cold and stuffy nose infantil, Tylenol plus Flu infantil, Tylenol plus cold & allergy infantil, Tylenol plus Cough & Runny Nose infantil, Tylenol plus Cough & Sore Throat infantil, Tylenol plus multi symptom cold infantil, Clinoril, Codral Cold and Flu, Codral Day and Night Day en comprimidos, Codral Day and Night Night en comprimidos, Codral Nighttime, Colazal, Combunox, Contac Cold plus Flu, Contac Cold plus Flu Non-Drowsy, Coricidin D, Coricidin HBP Cold and Flu, Coricidin HBP Day and Night Multi-Symptom Cold, Coricidin HBP Maximum Strength Flu, Coricidin HBP Nighttime Multi-Symptom Cold, Coricidin II Extra Strength Cold and Flu, CS502, CS670, Daypro, Daypro Alta, DDS06C, Demazin Cold and Flu, Demazin Cough, Cold and Flu, Demazin day/night Cold and Flu, Demazin PE Cold and Flu, Demazin PE day/night Cold and Flu, Diclofenac HPBCD, Dimetapp Day Relief, Dimetapp Multi-Symptom Cold and Flu, Dimetapp Night Relief, Dimetapp Pain and Fever Relief, Dimetapp PE Sinus Pain, Dimetapp PE Sinus Pain plus Allergy, Dipentum, Diractin, Disprin Cold 'n' Fever, Disprin Extra, Disprin Forte, Disprin Plus, Dristan Cold, Dristan Junior, Drixoral Plus, Duexis, Dynastat, Efferalgan, Efferalgan Plus Vitamina C, Efferalgan Vitamina C, Elixsure IB, Excedrin Back and Body, Excedrin Migraine, Excedrin PM, Excedrin Sinus Headache, Excedrin Tension Headache, Falcol, Fansamac, Feldene, FeverAll, Fiorinal, Fiorinal con Codeína, Flanax, Flector Patch, Flucam, Fortagesic, Gerbin, Giazo, Gladio, Goody's Back and Body Pain, Goody's Cool Orange, Goody's Extra Strength, Goody's PM, Greaseless Bengay, GW406381, HCT1026, He Xing Yi, Hyanalgese-D, HydrocoDex, Ibuprofeno Sódico PFIZER, Ibuprofeno con, Acetaminofeno PFIZER, Icy Hot SANOFI AVENTIS, Impracor, Indocin, Indometacina APP PHARMA, Indometacina MYLAN, Tylenol para bebés, IP880, IP940, Iremod, ISV205, JNS013, Jr. Tylenol, Junifen, Junior Strength Advil, Junior Strength Motrin, Ketoprofeno TDS, Lemsip Max, Lemsip Max All in One, Lemsip Max All Night, Lemsip Max Cold and Flu, Lialda, Enjuague bucal Listerine, Crema Lloyds, Lodine, Lorfit P, Loxonin, LTNS001, Mersyndol, Mesalamina SALIX, Mesalamina SOFAR, Mesalazina, Mesasal GLAXO, Mesasal SANOFI, Mesulid, Metsal Heat Rub, Midol Complete, Midol Extended Relief, Midol Liquid Gels, Midol PM, Midol Teen Formula, Migranin COMPRIMIDOS REVESTIDOS, ML3000, Mobic, Mohrus, Motrin, Motrin Cold and Sinus Pain, Motrin PM, Movalis ASPEN, MRX7EAT, Nalfon, Nalfon PEDINOL, Naprelan, Naprosyn, Naprosyn RPG LIFE SCIENCE, Naproxeno IROKO, NCX4016, NCX701, NeoProfen LUNDBECK, Nevanac, Nexcede, Niflan, Norgesic MEDICIS, Novalgin, Nuprin SCOLR, Nurofen, Nurofen Cold and Flu, Nurofen Max Strength Migraine, Nurofen Plus, Nuromol, NyQuil con Vitamina C, Ocufen, OMS103HP, Oralease, Orudis ABBOTT JAPAN, Oruvail, Osteluc, Oxycodex, P54, Panadol, Panadol Actifast, Paradine, Paramax, Parfenac, Pedeia, Pennsaid, Pentasa, Pentasa ORIFARM, Peon, Percodan, Percodan-Demi, PercoDex, Percogesic, Perfalgan, PL2200, PL3100, Ponstel, Prexige, Prolensa, PSD508, R-Ketoprofeno, Rantudil, Relafen, Remura, Robaxisal, Rotec, Rowasa, ROX828, RP19583, RQ00317076, Rubor, Salofalk, Salonpas, Saridon, SDX101, Seltouch, sfRowasa, Shinbaro, Sinumax, Sinutab, Sinutab, sinus, Spalt, Sprix, Strefen, Sudafed Cold and Cough, Sudafed Head Cold and Sinus, Sudafed PE Cold plus Cough, Sudafed PE Pressure plus Pain, Sudafed PE, Severe Cold, Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Day en comprimidos, Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Night en comprimidos, Sudafed PE Sinus plus Anti-inflammatory Pain Relief, Sudafed Sinus Advance, Surgam, Synalgos-DC, Synflex, Tavist allergy/sinus/headache, TDS943, TDT070, Theraflu Cold and Sore Throat, Theraflu Daytime Severe Cold and Cough, Theraflu Daytime Warming Relief, Theraflu Warming Relief Caplets Daytime Multi-Symptom Cold, Theraflu Warming Relief Cold and Chest Congestion, Thomapyrin, Thomapyrin C, Thomapyrin Efervescente, Thomapyrin Medium, Tilcotil, Tispol, Tolectin, Toradol, TPR100, TQ1011, Trauma-Salbe, Trauma-Salbe Kwizda, Treo, Treximet, Trovex, TT063, Tylenol, Tylenol Allergy Multi-Symptom, Tylenol Back Pain, Tylenol Cold & Cough Daytime, Tylenol Cold & Cough Nighttime, Tylenol Cold and Sinus Daytime, Tylenol Cold and Sinus Nighttime, Tylenol Cold Head Congestion Severe, Tylenol Cold Multi Symptom Daytime, Tylenol Cold Multi Symptom Nighttime Liquid, Tylenol Cold Multi Symptom Severe, Tylenol Cold Non-Drowsiness Formula, Tylenol Cold Severe Congestion Daytime, Tylenol Complete Cold, Cough and Flu Night time, Tylenol Flu Nighttime, Tylenol Menstrual, Tylenol PM, Tylenol Sinus Congestion & Pain Daytime, Tylenol Sinus Congestion & Pain Nighttime, Tylenol Sinus Congestion & Pain

Severe, Tylenol Sinus Severe Congestion Daytime, Tylenol Ultra Relief, Tylenol con cafeína y fosfato de codeína, Tylenol con fosfato de codeína, Ultra Strength Bengay Cream, Ultracet, UR8880, V0498TA01A, Vicks NyQuil Cold and Flu Relief, Vicoprofen, Vimovo, Voltaren Emulgel, Voltaren GEL, Voltaren NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH, Voltaren XR, VT122, Xefo, Xefo Rapid, Xefocam, Xibrom, XL3, Xodol, XP20B, XP21B, XP21L, Zipsor, y Zoenasa. En otro aspecto, los inhibidores de COX-2 pueden identificarse a través de métodos conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, Dannhardt, G. y Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. 2001. Eur. J. Med. Chem. 36: 109-126). En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se usa para tratar, prevenir o inhibir la metástasis en un paciente con cáncer de pulmón avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se usa en combinación con un segundo tratamiento. En algunos aspectos, el segundo tratamiento es cualquier tratamiento descrito en el presente documento. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se usa en combinación con un segundo tratamiento seleccionado del grupo que consiste en: Denosumab, Zometa (http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&Novald=2935376934467633633; última consulta el 2/12/2012), Carbozantinib o Cabozantinib, Anticuerpo o péptido que bloquea la PTHLH (hormona similar a la hormona paratiroidea) o PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea).

En un aspecto preferido, la terapia con radio 223 es Alpharadin (también conocido como Xofigo) (dicloruro de radio-223). Alpharadin usa radiación alfa de la desintegración del radio-223 para destruir las células cancerosas. El radio-223 se auto-dirige naturalmente a metástasis óseas en virtud de sus propiedades como imitador del calcio. La radiación alfa tiene un alcance muy corto de 2-10 células (en comparación con la radioterapia actual que se basa en la radiación beta o gamma) y, por lo tanto, causa menos daño a los tejidos sanos circundantes (particularmente la médula ósea). Con propiedades similares al calcio, el radio-223 es atraído a lugares donde se usa el calcio para formar huesos en el cuerpo, incluyendo el sitio de crecimiento óseo anormal y más rápido - tal como el que se observa en las metástasis esqueléticas de hombres con cáncer de próstata avanzado, resistente a la castración. El radio-223, después de la inyección, es transportado en el torrente sanguíneo a sitios de crecimiento óseo anormal. El lugar donde un cáncer comienza en el cuerpo se conoce como el tumor primario. Algunas de estas células pueden desprenderse y ser transportadas en el torrente sanguíneo a otra parte del cuerpo. Las células cancerosas pueden asentarse en esa parte del cuerpo y formar un nuevo tumor. Si esto sucede, se llama cáncer secundario o metástasis. La mayoría de los pacientes con cáncer de próstata en estadio avanzado sufren la carga máxima de enfermedad en sus huesos. El objetivo con el radio-223 es atacar selectivamente este cáncer secundario. Cualquier radio-223 no absorbido en los huesos se encamina rápidamente hacia el intestino y se excreta. En un aspecto preferido, el agente que previene la degradación ósea es un bifosfonato. En un aspecto aún más preferido, el bifosfonato es el ácido zoledrónico.

Como alternativa, se puede llevar a cabo un tratamiento combinado en el que más de un agente de los mencionados anteriormente se combinan para tratar y/o prevenir la metástasis o dichos agentes se pueden combinar con otros suplementos, tales como calcio o vitamina D o con un tratamiento hormonal.

Método de diagnóstico o pronóstico de metástasis en cáncer de pulmón basándose en la detección de la amplificación del gen c-MAF

En un aspecto, la invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico de metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón (en lo sucesivo, quinto método de diagnóstico de la invención) y/o para el pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón que comprende la determinación de si el gen c-MAF está amplificado en una muestra de tejido tumoral de dicho sujeto; en el que si dicho gen está amplificado con respecto a una muestra de control, entonces dicho sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis, en el que la amplificación del gen c-MAF se determina mediante la determinación de la amplificación del locus 16q22-q24.

En una realización particular, el cáncer de pulmón diagnosticado en el cuarto método de la invención es NSCLC.

Las expresiones "gen c-MAF", "metástasis", "muestra de tumor", "cáncer de pulmón", "diagnóstico de metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón", "pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón", "sujeto", "paciente", "sujeto que tiene un diagnóstico positivo de metástasis", "sujeto que tiene una mayor tendencia a desarrollar metástasis" se han descrito en detalle en el contexto del primer método desvelado y son igualmente aplicables al quinto método de la invención.

El grado de amplificación del gen c-MAF se determina por medio de la determinación de la amplificación de una región cromosómica que contiene dicho gen. La región cromosómica cuya amplificación es indicativa de la existencia de la amplificación del gen c-MAF es el locus 16q22-q24 que incluye el gen c-MAF. El locus 16q22-q24 está situado en el cromosoma 16, en el brazo largo de dicho cromosoma y en un intervalo entre la banda 22 y la banda 24. Esta región corresponde en la base de datos del NCBI con los cóntigos NT_010498.15 y NT_010542.15. En otra realización preferida, el grado de amplificación del gen c-MAF se puede determinar por medio del uso de una sonda específica para dicho gen.

El quinto método de diagnóstico/pronóstico de la invención comprende, en una primera etapa, determinar si el gen c-MAF se amplifica en una muestra de tumor de un sujeto. Para ese fin, se compara la amplificación del gen c-MAF en

la muestra de tumor con respecto a una muestra de control.

La expresión "amplificación de un gen" como se entiende en el presente documento se refiere a un proceso a través del cual se forman diversas copias de un gen o de un fragmento de gen en una célula individual o una línea celular.

5 Las copias del gen no están necesariamente situadas en el mismo cromosoma. La región duplicada a menudo se llama un "amplicón". Normalmente, la cantidad de ARNm producido, es decir, el nivel de expresión génica también aumenta en proporción al número de copias de un gen particular.

10 En una realización particular, la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón y/o para el pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón, comprende determinar el número de copias del gen c-MAF en una muestra de tumor de dicho sujeto y comparar dicho número de copias con el número de copias de una muestra de control o de referencia, en el que si el número de copias de c-MAF es mayor con respecto al número de copias de c-MAF de una muestra de control, entonces el sujeto tiene un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis.

15 La muestra de control se refiere a una muestra de tumor de un sujeto con cáncer de pulmón que no ha experimentado metástasis o que corresponde al valor mediano del número de copias del gen c-MAF medido en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de pulmón que no han experimentado metástasis. Dicha muestra de referencia se obtiene normalmente combinando cantidades iguales de muestras de
20 una población de sujetos. Si el número de copias del gen c-MAF aumenta con respecto al número de copias de dicho gen en la muestra de control, entonces el sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis.

25 Como se usa en el presente documento, el término "número de copias del gen" se refiere al número de copias de una molécula de ácido nucleico en una célula. El número de copias del gen incluye el número de copias del gen en el ADN genómico (cromosómico) de una célula. En una célula normal (célula no tumoral), el número de copias del gen es normalmente dos copias (una copia en cada miembro del par de cromosomas). El número de copias del gen a veces incluye la mitad del número de copias del gen tomado de muestras de una población celular.

30 En la presente invención, "número de copias del gen aumentado" se entiende como cuando el número de copias del gen c-MAF es mayor que el número de copias que tiene una muestra de referencia o muestra de control. En particular, se puede considerar que una muestra tiene un número de copias de c-MAF aumentado cuando el número de copias es más de 2 copias, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 copias, e incluso más de 10 copias del gen c-MAF.

35 En algunos aspectos, la amplificación está en la región en el locus 16q23. En algunas realizaciones, la amplificación está en cualquier parte de la región cromosómica entre aproximadamente Cr. 16 - aproximadamente 79.392.959 pb hasta aproximadamente 79.663.806 pb (de centrómero a telómero). En algunos aspectos, En algunos aspectos, la amplificación está en la región genómica entre aproximadamente Cr. 16 - aproximadamente 79.392.959 pb hasta
40 aproximadamente 79.663.806 pb, pero excluyendo elementos repetitivos de ADN. En algunos aspectos, la amplificación se mide usando una sonda específica para esa región.

En una realización particular, la amplificación o el número de copias se determina por medio de hibridación *in situ* o PCR.

45 Métodos para determinar si el gen c-MAF o la región cromosómica 16q22-q24 están amplificados son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Dichos métodos incluyen, sin limitación, hibridación *in situ* (ISH) (tal como hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), hibridación *in situ* cromógena (CISH) o hibridación *in situ* con plata (SISH)), hibridación comparativa genómica o reacción en cadena de la polimerasa (tal como PCR cuantitativa en tiempo real). Para cualquier método de ISH, la amplificación o el número de copias se pueden determinar contando
50 el número de puntos fluorescentes, puntos de color o puntos con plata en los cromosomas o en el núcleo.

La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) es una técnica citogenética que se usa para detectar y ubicar la presencia o ausencia de secuencias específicas de ADN en los cromosomas. FISH usa sondas de fluorescencia que solo se unen a algunas partes del cromosoma con las que muestran un alto grado de similitud de secuencia. En un
55 método típico de FISH, la sonda de ADN está etiquetada con una molécula fluorescente o un hapteno, normalmente en forma de flúor-dUTP, digoxigenina-dUTP, biotina-dUTP o hapteno-dUTP, que se incorpora en el ADN usando reacciones enzimáticas, tales como traducción de muestra o PCR. La muestra que contiene el material genético (los cromosomas) se coloca en portaobjetos de vidrio y se desnaturaliza mediante un tratamiento con formamida. La sonda etiquetada se hibrida a continuación con la muestra que contiene el material genético en condiciones
60 adecuadas que serán determinadas por el experto en la materia. Después de la hibridación, la muestra se observa directamente (en el caso de una sonda etiquetada con flúor) o indirectamente (usando anticuerpos marcados con fluorescencia para detectar el hapteno).

65 En el caso de CISH, la sonda se etiqueta con digoxigenina, biotina o fluoresceína y se hibrida con la muestra que contiene el material genético en condiciones adecuadas.

Se puede usar cualquier molécula de marcado o etiquetado que pueda unirse a un ADN para etiquetar las sondas usadas en el quinto método de la invención, permitiendo de este modo la detección de moléculas de ácido nucleico. Los ejemplos de etiquetas para el etiquetado incluyen, aunque sin limitación, isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, cofactores, ligandos, agentes de quimioluminiscencia, fluoróforos, haptenos, enzimas y combinaciones de los mismos. Los métodos de etiquetado y las directrices para seleccionar etiquetas adecuadas para diferentes fines se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) y Ausubel *et al.* (In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Nueva York, 1998).

Una vez que se determina la existencia de la amplificación, ya sea determinando directamente la amplificación del gen c-MAF o determinando la amplificación del locus 16q22-q24, y después de haberla comparado con la amplificación de dicho gen en la muestra de control, si se detecta la amplificación en el gen c-MAF, esto es indicativo del hecho de que el sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis.

Es necesario que la determinación de la amplificación del gen c-MAF se correlacione con valores de una muestra de control o muestra de referencia que correspondan al nivel de amplificación del gen c-MAF medido en una muestra de tejido tumoral de un sujeto con cáncer de pulmón que no ha experimentado metástasis o correspondan al valor mediano de la amplificación del gen c-MAF medido en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de pulmón que no han experimentado metástasis. Dicha muestra de referencia se obtiene normalmente combinando cantidades iguales de muestras de una población de sujetos. En general, las muestras de referencia típicas se obtendrán de sujetos que están clínicamente bien documentados y en los que la ausencia de metástasis está bien caracterizada. La colección de muestras de la que se deriva el nivel de referencia estará compuesta preferentemente por sujetos que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente objeto del estudio (por ejemplo, NSCLC). Una vez que se ha establecido este valor mediano, el nivel de amplificación de c-MAF en tejidos tumorales de pacientes se puede comparar con este valor mediano y, por tanto, si hay amplificación, el sujeto tiene un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis.

En una realización preferida, la metástasis es metástasis ósea. En una realización aún más preferida, la metástasis ósea es metástasis ósea osteolítica. Como se usa en el presente documento, la expresión "metástasis ósea osteolítica" se refiere a un tipo de metástasis en la que se produce una resorción ósea (pérdida progresiva de la densidad ósea) en las inmediaciones de la metástasis que resulta de la estimulación de la actividad de los osteoclastos por las células tumorales y se caracteriza por dolor severo, fracturas patológicas, hipercalcemia, compresión de la médula espinal y otros síndromes resultantes de la compresión nerviosa.

Método de pronóstico de metástasis en cáncer de pulmón basándose en la detección de la translocación del gen c-MAF

En otro aspecto, se desvela un método *in vitro* para predecir el desenlace clínico de un paciente que padece cáncer de pulmón, que comprende determinar si el gen c-MAF está translocado en una muestra de dicho sujeto, en el que una translocación del gen c-MAF es indicativa de un mal desenlace clínico.

En otro aspecto, se desvela un método *in vitro* para predecir el desenlace clínico de un paciente que padece cáncer de pulmón, que comprende determinar si el gen c-MAF está translocado en una muestra de dicho sujeto, en el que una translocación del gen c-MAF es indicativa de un mal desenlace clínico.

En algunos aspectos, el gen translocado es de la región en el locus 16q23. En algunos aspectos, el gen translocado es de cualquier parte de la región cromosómica entre aproximadamente Cr. 16 - aproximadamente 79.392.959 pb hasta aproximadamente 79.663.806 pb (de centrómero a telómero). En algunos aspectos, el gen translocado es de la región genómica entre aproximadamente Cr. 16 - aproximadamente 79.392.959 pb hasta aproximadamente 79.663.806 pb, pero excluyendo elementos repetitivos de ADN. En algunos aspectos, la translocación se mide usando una sonda específica para esa región.

En un aspecto particular, la translocación del gen c-MAF se puede determinar por medio de la determinación de la translocación de una región cromosómica que contiene dicho gen. En un aspecto, la translocación es la translocación t(14,16). En otro aspecto, la región cromosómica que se transloca es del locus 16q22-q24. El locus 16q22-q24 está situado en el cromosoma 16, en el brazo largo de dicho cromosoma y en un intervalo entre la banda 22 y la banda 24. Esta región corresponde en la base de datos del NCBI con los cóntigos NT 010498.15 y NT 010542.15. En un aspecto preferido, el gen c-MAF se transloca al cromosoma 14 en el locus 14q32, dando como resultado la translocación t(14,16)(q32,q23). Esta translocación coloca el gen MAF junto a los potentes potenciadores en el locus IgH, lo que, en algunos casos, causa la sobreexpresión de MAF. (Eychène, A., Rocques, N., y Puoponnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8: 683-693.)

En un aspecto preferido, la translocación del gen c-MAF se puede determinar por medio del uso de una sonda específica para dicha translocación. En algunos aspectos, la translocación se mide usando una sonda de doble color. En algunos aspectos, la translocación se mide usando una sonda de doble fusión. En algunos aspectos, la

translocación se mide usando una sonda de doble dual, de doble color. En algunos aspectos, la translocación se mide utilizando dos sondas independientes.

En otro aspecto preferido, la translocación del gen c-MAF se determina usando la sonda de doble fusión Vysis LSI IGH/MAF Dual Color (<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-igh-maf-dual-color-dual-fusion-probe.html>; última consulta el 5/11/2012), que comprende una sonda contra 14q32 y 16q23. En otra realización preferida, la translocación del gen c-MAF se determina usando una sonda de fusión MAF/IGH gt(14; 16) de Kreatech diagnostics (<http://www.kreatech.com/products/repeat-freetm-posedontm-fish-probes/hematology/maf-igh-gt1416-fusion-probe.html>; última consulta el 5/11/2012), una sonda MAF FISH de Abnova (http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?Catalog_id=FA0375; última consulta el 5/11/2012), una sonda de translocación IGH/MAF Two Color, Two Fusion de Cancer Genetics Italia (<http://www.cancer-genetics-italia.com/dna-fish-probe/ighmaf/>; última consulta el 5/11/2012), una sonda de FISH IGH/MAF-t(14;16)(q32;q23) de Creative Bioarray (<http://www.creative-bioarray.com/products.asp?cid=35&page=10>; última consulta el 5/11/2012), un panel de mieloma múltiple mediante FISH de Arup Laboratories (<http://www.aruplab.com/files/technical-bulletins/Multiple%20Myeloma%20%28MM%29%20by%20FISH.pdf>; última consulta el 5/11/2012), una sonda de Agilent específica para 16q23 o 14q32 (<http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?chr=16&start=79483700&end=79754340>; última consulta el 5/11/2012; <http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?Pageid=3000&ProductID=637>; última consulta el 5/11/2012), una sonda de Dako específica para 16q23 o 14q32 (http://www.dako.com/us/ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?setCountry=true&purl=ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?undefined&submit=Accept%20country; última consulta el 5/11/2012), una sonda de doble fusión, de translocación IGH/MAF de Cytocell (http://www.zentech.be/uploads/docs/products_info/prenatalogy/cytocell%202012-2013%20catalogue%5B3%5D.pdf; última consulta el 5/11/2012), una sonda de doble fusión de translocación XL IGH / MAF de Metasystems (http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com_joob&view=article&joobase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272; última consulta el 5/11/2012), una sonda de FISH XL de Zeiss, 100 µl, IGH /MAFB (<https://www.microshop.zeiss.com/?s=440675675dedc6&l=en&p=uk&f=r&i=5000&o=&h=25&n=1&sd=00000-0528-231-uk>; última consulta el 5/11/2012) o una sonda de doble fusión IGH/MAF de Genycell Biotech (http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=l&ved=OCCQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.genycell.es%2Fimages%2Fproductos%2Fbrochures%2Fiphmie686.ppt&ei=MhGYUOi3GKWHOQGlt4DoDw&usq=AFQjCNEqQMbt8vQQGjJbi9riEf31VgoFTFQ&sig2=V5IS8juEMVHB18Mv2Xx_Ww; última consulta el 5/11/2012)

En algunos aspectos, la etiqueta de la sonda es un fluoróforo. En algunos aspectos, el fluoróforo en la sonda es naranja. En algunos aspectos, el fluoróforo en la sonda es verde. En algunos aspectos, el fluoróforo en la sonda es rojo. En algunos casos, el fluoróforo en la sonda es amarillo. En algunos aspectos, una sonda está etiquetada con un fluoróforo rojo y otra con un fluoróforo verde. En algunos aspectos, una sonda está etiquetada con un fluoróforo verde y otra con un fluoróforo naranja. En algunos casos, el fluoróforo en la sonda es amarillo. Por ejemplo, si la sonda específica de MAF está etiquetada con un fluoróforo rojo, y la sonda específica de IGH está etiquetada con un fluoróforo verde, si se ve blanco, esto indica que las señales se superponen y se ha producido una translocación.

En algunos aspectos, el fluoróforo es SpectrumOrange. En algunos aspectos, el fluoróforo es SpectrumGreen. En algunos aspectos, el fluoróforo es DAPI. En algunos aspectos, el fluoróforo es PlatinumBright405. En algunos aspectos, el fluoróforo es PlatinumBright415. En algunos aspectos, el fluoróforo es PlatinumBright495. En algunos aspectos, el fluoróforo es PlatinumBright505. En algunos aspectos, el fluoróforo es PlatinumBright550. En algunos aspectos, el fluoróforo es PlatinumBright547. En algunos aspectos, el fluoróforo es PlatinumBright570. En algunos aspectos, el fluoróforo es PlatinumBright590. En algunos aspectos, el fluoróforo es PlatinumBright647. En algunos aspectos, el fluoróforo es PlatinumBright495/550. En algunos aspectos, el fluoróforo es PlatinumBright415/495/550. En algunos aspectos, el fluoróforo es DAPI/PlatinumBright495/550. En algunos aspectos, el fluoróforo es FITC. En algunos aspectos, el fluoróforo es Rojo Texas. En algunos aspectos, el fluoróforo es DEAC. En algunos aspectos, el fluoróforo es R6G. En algunos aspectos, el fluoróforo es Cy5. En algunos aspectos, el fluoróforo es FITC, Rojo Texas y DAPI. En algunos aspectos, se usa una contratinción con DAPI para visualizar la translocación, la amplificación o la alteración del número de copias.

Un aspecto de la divulgación comprende un método en el que, en una primera etapa, se determina si el gen c-MAF está translocado en una muestra de un sujeto. En un aspecto preferido, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

En un aspecto particular, un método de la divulgación para el pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis ósea en un sujeto con cáncer de pulmón comprende determinar el número de copias del gen c-MAF en una muestra de dicho sujeto, en la que el gen c-MAF está translocado y comparar dicho número de copias con el número de copias de una muestra de control o de referencia, en el que si el número de copias de c-MAF es mayor con respecto al número de copias de c-MAF de una muestra de control, entonces el sujeto tiene una mayor tendencia a desarrollar metástasis ósea. En un aspecto preferido, la metástasis ósea es una metástasis ósea muy temprana. En un aspecto preferido, la metástasis ósea es metástasis osteolítica.

"Nivel promedio", como se usa en el presente documento, se refiere a un solo valor del nivel de expresión de c-MAF (como media, modo o mediana) que resume o representa la importancia general de un conjunto de valores desiguales. En un aspecto preferido, el nivel promedio corresponde al promedio de los niveles de expresión obtenidos de una cohorte representativa de tumores de cáncer de pulmón. La cohorte de pacientes se define por la edad que es representativa del paciente individual que se intenta evaluar.

"Desviación estándar", como se usa en el presente documento, se refiere a una medida de la dispersión de una colección de números. Por ejemplo, la desviación estándar para el nivel normal promedio de c-MAF es la dispersión de una colección de los niveles de c-MAF descubiertos en muestras de tumores de pulmón. Cuanto más dispersos estén los datos, mayor será la desviación. La desviación estándar se puede obtener extrayendo la raíz cuadrada de la media de desviaciones cuadradas de los valores observados a partir de su media en una distribución de frecuencia.

Una vez que el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de un sujeto con cáncer de pulmón se haya medido y comparado con el nivel promedio, si el nivel de expresión de dicho gen está por encima del promedio más una desviación estándar con respecto al nivel promedio, entonces se puede concluir que dicho sujeto tiene una mayor tendencia a desarrollar metástasis ósea temprana.

Métodos para determinar si el gen c-MAF o la región cromosómica 16q22-q24 están translocados son ampliamente conocidos en el estado de la técnica e incluyen los descritos previamente para la amplificación de c-MAF. Dichos métodos incluyen, sin limitación, hibridación *in situ* (ISH) (tal como hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), hibridación *in situ* cromógena (CISH) o hibridación *in situ* con plata (SISH)), hibridación comparativa genómica o reacción en cadena de la polimerasa (tal como PCR cuantitativa en tiempo real). Para cualquier método de ISH, la amplificación, el número de copias o la translocación se pueden determinar contando el número de puntos fluorescentes, puntos de color o puntos con plata en los cromosomas o en el núcleo. En otros aspectos, la detección de alteraciones y translocaciones del número de copias se puede detectar mediante el uso de secuenciación del genoma completo, secuenciación del exoma o mediante el uso de cualquier tecnología derivada de PCR. Por ejemplo, la PCR se puede realizar en muestras de ADN genómico para detectar la translocación. En un aspecto, se usa PCR cuantitativa. En un aspecto, la PCR se realiza con un cebador específico para el gen c-MAF y un cebador específico para la región promotora de IGH; si se produce un producto, se ha producido la translocación.

En algunos aspectos, la amplificación y el número de copias del gen c-MAF se determinan después de que se determine la translocación del gen c-MAF. En algunos aspectos, la sonda se usa para determinar si la célula es poliploide para el gen c-MAF. En algunos aspectos, la determinación de la poliploidía se realiza determinando si hay más de 2 señales del gen de interés. En algunos aspectos, la poliploidía se determina midiendo la señal de la sonda específica para el gen de interés y comparándola con una sonda centromérica u otra sonda.

Método de pronóstico del desenlace clínico en cáncer de pulmón basándose en la detección de la amplificación o la translocación del gen c-MAF

En otro aspecto, se desvela un método *in vitro* (en lo sucesivo, octavo método desvelado) para predecir el desenlace clínico de un paciente que padece cáncer de pulmón, que comprende determinar si el gen c-MAF está amplificado o translocado en una muestra de dicho sujeto en relación con el número de copias de un gen de referencia, en el que una amplificación del gen c-MAF con respecto a dicho número de copias del gen de referencia es indicativo de un mal desenlace clínico.

El octavo método desvelado comprende, en una primera etapa, determinar si el gen c-MAF se amplifica en una muestra de un sujeto. La determinación de la amplificación del c-MAF se lleva a cabo esencialmente como se describe en el quinto método de la invención. En un aspecto preferido, la muestra es una muestra de tejido tumoral. En un aspecto preferido, la amplificación del gen c-MAF se determina mediante la determinación de la amplificación del locus 16q23 o 16q22-q24. En otro aspecto preferido, la amplificación del gen c-MAF se puede determinar por medio del uso de una sonda específica del gen c-MAF.

En una segunda etapa, el octavo método desvelado comprende comparar dicho número de copias con el número de copias de una muestra de control o de referencia, en el que si el número de copias de c-MAF es mayor con respecto al número de copias de c-MAF de una muestra de control, entonces esto es indicativo de un mal desenlace clínico.

En un aspecto preferido, el gen c-MAF está amplificado con respecto al número de copias de un gen de referencia cuando el número de copias del gen c-MAF es mayor que el número de copias que tiene una muestra de referencia o muestra de control. En un ejemplo, se dice que el gen c-MAF está "amplificado" si el número de copias genómicas del gen c-MAF ha aumentado en al menos 2 (es decir, 6 copias), 3 (es decir, 8 copias), 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 veces en una muestra de ensayo con respecto a una muestra de control. En otro ejemplo, se dice que un gen c-MAF está "amplificado" si el número de copias genómicas del gen c-MAF por célula es al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y similares.

En otro aspecto, En otro aspecto, el número de copias del gen de referencia es el número de copias del gen en una

muestra de cáncer de pulmón, de un sujeto que no ha experimentado metástasis ósea.

En otro aspecto, la amplificación se determina por medio de hibridación in situ o PCR.

Métodos terapéuticos

5

Tratamiento de metástasis ósea usando agentes inhibidores de c-MAF

Se puede usar un agente inhibidor de la expresión del gen c-MAF o un agente inhibidor de la proteína codificada por dicho gen en el tratamiento y/o la prevención de la metástasis del cáncer de pulmón.

10

En otro aspecto, se desvela el uso de un agente inhibidor de c-MAF para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer de pulmón con metástasis ósea.

15

En otro aspecto, se desvela un método para el tratamiento o prevención de la metástasis ósea de cáncer de pulmón, en un sujeto que lo necesita, que comprende la administración a dicho sujeto de un agente inhibidor de c-MAF.

20

En otro aspecto, se desvela un método para prevenir o reducir el riesgo de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de pulmón, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto un agente que previene o reduce la metástasis ósea, en el que dicho agente se administra de acuerdo con un régimen de tratamiento determinado a partir de la cuantificación del nivel de expresión de c-MAF en dicho sujeto.

25

Por lo tanto, en otro aspecto, se desvela el uso de un agente inhibidor de la expresión del gen c-MAF o un agente inhibidor de la proteína codificada por dicho gen (en lo sucesivo, agente inhibidor desvelado) en la preparación de una especialidad farmacéutica para tratar y/o prevenir la metástasis del cáncer de pulmón. Como alternativa, la divulgación se refiere a un agente inhibidor de la expresión del gen c-MAF o un agente inhibidor de la proteína codificada por dicho gen para uso en el tratamiento y/o la prevención de la metástasis del cáncer de pulmón. Como alternativa, se desvela un método para tratar la metástasis del cáncer de pulmón en un sujeto que comprende administrar un inhibidor de c-MAF a dicho sujeto.

30

Como se usa en el presente documento, un "agente inhibidor de c-MAF" se refiere a cualquier molécula capaz de inhibir total o parcialmente la expresión del gen c-MAF, tanto impidiendo que se produzca el producto de expresión de dicho gen (interrumpiendo la transcripción del gen c-MAF y/o bloqueando la traducción del ARNm procedente de la expresión del gen c-MAF) como inhibiendo directamente la actividad de la proteína c-MAF. Los inhibidores de la expresión del gen c-MAF se pueden identificar usando métodos basados en la capacidad del llamado inhibidor para bloquear la capacidad de c-MAF de promover la proliferación celular *in vitro*, como se muestra en la solicitud de patente internacional WO2005/046731, basándose en la capacidad del llamado inhibidor para bloquear la capacidad de transcripción de un gen indicador bajo el control del promotor de la ciclina D2 o de un promotor que contiene la región de respuesta a c-MAF (elemento sensible a MARE o c-MAF) en células que expresan c-MAF tal como se describe en el documento WO2008098351 o basándose en la capacidad del llamado inhibidor para bloquear la expresión de un gen indicador bajo el control del promotor de IL-4 en respuesta a la estimulación con PMA/ionomicina en células que expresan NFATc2 y c-MAF tal como se describe en el documento US2009048117A.

35

40

A modo de ilustración no limitante, los agentes inhibidores de c-MAF adecuados para uso en la presente divulgación incluyen oligonucleótidos antisentido, ARN de interferencia (ARNip), ARN catalíticos o ribozimas específicas y anticuerpos inhibidores.

Oligonucleótidos antisentido

45

Un aspecto adicional se refiere al uso de ácidos nucleicos "antisentido" aislados para inhibir la expresión, por ejemplo, para inhibir la transcripción y/o la traducción de un ácido nucleico que codifica c-MAF, cuya actividad debe inhibirse. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden unir a la potencial diana del fármaco por medio de complementariedad de bases convencional o, por ejemplo, en el caso de la unión al ADN bicatenario a través de la interacción específica en el surco grande de la doble hélice. En general, estos métodos se refieren a una gama de técnicas generalmente usadas en la técnica e incluyen cualquier método que se basa en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

50

55

Una construcción antisentido de la presente divulgación se puede administrar, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN complementario a al menos una parte única del ARNm celular que codifica c-MAF. Como alternativa, la construcción antisentido es una sonda oligonucleotídica generada *ex vivo* que, cuando se introduce en la célula, produce inhibición de la expresión génica hibridando con el ARNm y/o las secuencias genéticas de un ácido nucleico diana. Dichas sondas oligonucleotídicas son preferentemente oligonucleótidos modificados que son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas y, por lo tanto, son estables *in vivo*. Ejemplos de moléculas de ácidos nucleicos para uso como oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN de fosforamidato, fosfotionato y metilfosfonato (véase también las patentes de Estados Unidos N° 5176996; 5264564; y 5256775). Adicionalmente, las aproximaciones generales para construir oligómeros útiles en la terapia antisentido se han revisado, por ejemplo, en

60

65

Van der Krol *et al.*, *BioTechniques* 6: 958-976, 1988; y *Stein et al.*, *Cancer Res* 48: 2659-2668, 1988.

Con respecto al oligonucleótido antisentido, se prefieren las regiones de oligodesoxirribonucleótido derivadas del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre -10 y +10 del gen diana. Las aproximaciones antisentido involucran el diseño de oligonucleótidos (ADN o ARN) que son complementarios al ARNm que codifica el polipéptido diana. El oligonucleótido antisentido se unirá al ARNm transcrito y se evitará la traducción.

Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del ARNm, por ejemplo la secuencia 5' no traducida hasta e incluyendo el codón de inicio AUG deben funcionar de la manera más eficiente para inhibir la traducción. No obstante, se ha demostrado que las secuencias complementarias a las secuencias 3' no traducidas del ARNm también son eficientes para inhibir la traducción del ARNm (Wagner, *Nature* 372: 333, 1994). Por lo tanto, podrían usarse oligonucleótidos complementarios en las regiones 5' o 3' no traducidas, regiones no codificantes de un gen en una aproximación antisentido para inhibir la traducción de ese ARNm. Los oligonucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm deben incluir el complemento del codón de inicio AUG. Los oligonucleótidos complementarios a la región codificante del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficientes, pero también podrían usarse de acuerdo con la divulgación. Si están diseñados para hibridar con la región 5', la región 3' o la región codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deben tener al menos seis nucleótidos de longitud y, preferentemente, tener menos de aproximadamente 100 y, más preferentemente, menos de aproximadamente 50, 25, 17 o 10 nucleótidos de largo.

Preferentemente, se realizan estudios *in vitro* primero para cuantificar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido para inhibir la expresión génica. Preferentemente, estos estudios usan controles que distinguen entre la inhibición del gen antisentido y los efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También preferentemente, estos estudios compararon los niveles de ARN o proteína diana con los de un control interno de ARN o proteína. Los resultados obtenidos usando los oligonucleótidos antisentido se pueden comparar con los obtenidos usando un oligonucleótido de control. Preferentemente, el oligonucleótido de control es de aproximadamente la misma longitud que el oligonucleótido a ensayar y que la secuencia de oligonucleótidos no difiere de la secuencia antisentido más de lo que se considera necesario para evitar la hibridación específica con la secuencia diana.

El oligonucleótido antisentido puede ser un ADN o ARN mono o bicatenario o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos. El oligonucleótido puede modificarse en el grupo base, el grupo azúcar o el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a los receptores de las células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 648-652, 1987; la publicación PCT No. WO 88/09810) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la publicación PCT No. WO 89/10134), agentes intercalantes (véase, por ejemplo, Zon, *Pharm. Res.* 5: 539-549, 1988). Para este fin, el oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de transporte, un agente de escisión activado por hibridación, etc.

Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos un grupo de base modificada. El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un grupo azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, aunque sin limitación, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa. El oligonucleótido antisentido también puede contener un esqueleto similar a un péptido neutro. Dichas moléculas se conocen como oligómeros de ácido peptidonucleico (APN) y se describen, por ejemplo, en Perry-O'Keefe *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 14670, 1996, y en Eglom *et al.*, *Nature* 365: 566, 1993.

En otro aspecto más, el oligonucleótido antisentido comprende al menos un esqueleto de fosfato modificado. En otro aspecto más, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido alfa-anomérico.

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

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

Como alternativa, la expresión del gen diana puede reducirse dirigiendo secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen (es decir, el promotor y/o los potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que impiden la transcripción del gen en las células diana en el cuerpo (véase, en general, Helene, *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569-84, 1991). En determinados aspectos, los oligonucleótidos antisentido son morfolininas antisentido.

ARNip

El ARN interferente pequeño o ARNip son agentes capaces de inhibir la expresión de un gen diana mediante la interferencia de ARN. Un ARNip puede sintetizarse químicamente, puede obtenerse mediante transcripción *in vitro* o puede sintetizarse *in vivo* en la célula diana. Normalmente, el ARNip consiste en un ARN bicatenario de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud y puede contener una región sobresaliente 3' y/o 5' de 1 a 6 nucleótidos. La longitud de la región sobresaliente es independiente de la longitud total de la molécula de ARNip. El ARNip actúa degradando o silenciando al mensajero diana después de la transcripción.

Los ARNip desvelados son sustancialmente homólogos al ARNm del gen que codifica c-MAF o a la secuencia génica que codifica dicha proteína. Se entiende que "sustancialmente homólogo" tiene una secuencia que es suficientemente complementaria o similar al ARNm diana, de modo que el ARNip es capaz de degradar este último a través de interferencia de ARN. El ARNip adecuado para causar dicha interferencia incluye ARNip formado por ARN, así como ARNip que contiene diferentes modificaciones químicas, tales como:

- ARNip en el que los enlaces entre los nucleótidos son diferentes de los que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces de fosforotionato.
- Conjugados de la cadena de ARN con un reactivo funcional, tal como un fluoróforo.
- Modificaciones de los extremos de las cadenas de ARN, particularmente del extremo 3' mediante la modificación con diferentes grupos funcionales hidroxilo en posición 2'.
- Nucleótidos con azúcares modificados tales como los residuos O-alkilados en la posición 2' como 2'-O-metilribosa o 2'-O-fluororribosa.
- Nucleótidos con bases modificadas, tales como bases halogenadas (por ejemplo, 5-bromouracilo y 5-yodouracilo), bases alquiladas (por ejemplo, 7-metilguanosina).

El ARNip se puede usar como tal, es decir, en forma de un ARN bicatenario con las características mencionadas anteriormente. Como alternativa, el uso de vectores que contienen la secuencia de la cadena sentido y antisentido del ARNip es posible bajo el control de promotores adecuados para la expresión de los mismos en la célula de interés.

Los vectores adecuados para expresar ARNip son aquellos en los que las dos regiones de ADN que codifican las dos cadenas de ARNip están dispuestas en tándem en una misma cadena de ADN separada por una región espaciadora que, tras la transcripción, forma un bucle y en la que un único promotor dirige transcripción de la molécula de ADN que da lugar a ARNhc.

Como alternativa, es posible el uso de vectores en los que cada una de las cadenas que forman el ARNip se forme a partir de la transcripción de una unidad transcripcional diferente. Estos vectores se dividen, a su vez, en vectores de transcripción divergentes y convergentes. En vectores de transcripción divergentes, las unidades de transcripción que codifican cada una de las cadenas de ADN que forman el ARNip están ubicadas en tándem en un vector, de modo que la transcripción de cada cadena de ADN depende de su propio promotor, que puede ser el mismo o diferente (Wang, J. *et al.*, 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 100:5103-5106 y Lee, N.S., *et al.*, 2002, Nat. Biotechnol., 20:500-505). En los vectores de transcripción convergentes, las regiones de ADN que dan lugar al ARNip forman las cadenas sentido y antisentido de una región de ADN que están flanqueadas por dos promotores inversos. Después de la transcripción de las cadenas de ARN sentido y antisentido, este último formará el híbrido para formar un ARNip funcional. Se han descrito vectores con sistemas de promotor inverso en los que se han usado 2 promotores U6 (Tran, N. *et al.*, 2003, BMC Biotechnol., 3:21), un promotor de U6 de ratón y un promotor de HI humano (Zheng, L., *et al.*, 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 135-140 and WO 2005026322) y un promotor U6 humano y un promotor HI de ratón (Kaykas, A. and Moon, R., 2004, BMC Cell Biol., 5:16).

Los promotores adecuados para su uso en la expresión de ARNip a partir de vectores de expresión convergentes o divergentes incluyen cualquier promotor o par de promotores compatibles con las células en las que se va a expresar el ARNip. Por tanto, los promotores adecuados para la presente divulgación incluyen, aunque sin limitación, promotores constitutivos, tales como los derivados de los genomas de virus eucariotas, tales como el virus del polioma, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de la metalotioneína, el promotor del gen de la timidina cinasa del virus del herpes simple, las regiones LTR del retrovirus, el promotor del gen de la inmunoglobulina, el promotor del gen de la actina, el promotor del gen alfa EF-1 así como los promotores inducibles en los que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o una señal exógena tal como el sistema de tetraciclina, el sistema de NFkappaB/luz UV, el sistema Cre/Lox y el promotor del gen de choque térmico, los promotores de la ARN polimerasa II regulables descritos en el documento WO/2006/135436, así como los promotores específicos de tejidos (por ejemplo, el promotor de PSA descrito en el documento WO2006012221). En un aspecto preferido, los promotores son promotores de ARN polimerasa III que actúan constitutivamente. Los promotores de la ARN polimerasa III se encuentran en un número limitado de genes tales como ARN 5S, ARNt, ARN 7SL y ARNnp U6. A diferencia de otros promotores de ARN polimerasa III, los promotores de tipo III no requieren ninguna secuencia intragénica, sino que necesitan secuencias en la dirección 5' que comprendan una caja TATA en las posiciones -34 y -24, un elemento de secuencia proximal o PSE entre -66 y -47 y, en algunos casos, un elemento de secuencia distal o DSE entre las posiciones -265 y -149. En un aspecto preferido, los promotores de la ARN polimerasa III de tipo III son los promotores de los genes H1 y U6 humanos o murinos. En un aspecto aún más preferido, los promotores son 2 promotores de U6 humanos o murinos, un

promotor de U6 de ratón y un promotor de H1 humano o un promotor de U6 humano y un promotor de H1 de ratón.

El ARNip puede generarse intracelularmente a partir del llamado ARNhc (ARN horquillado corto) caracterizado por que las cadenas antiparalelas que forman el ARNip están conectadas por un bucle o región de horquilla. Los ARNhc pueden ser codificados por plásmidos o virus, particularmente retrovirus, y están bajo el control de un promotor. Los promotores adecuados para expresar ARNhc son aquellos indicados en el párrafo anterior para expresar ARNip.

Los vectores adecuados para expresar ARNip y ARNhc incluyen vectores de expresión procariotas tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, fagos y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28, vectores de expresión en levaduras, tales como vectores de tipo plásmido de 2 micrones, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insecto tales como vectores de series pAC y vectores de series pVL, vectores de expresión en plantas tales como pBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, vectores de la serie pORE y similares y basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados con adenovirus, así como retrovirus y particularmente lentivirus) vectores de expresión en células eucariotas superiores o vectores no virales tales como pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL y pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1. En un aspecto preferido, los vectores son vectores lentivirales.

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

Los ARNip específicos de c-MAF incluyen el ARNip descrito en el documento WO2005046731, una de las cadenas del cual es ACGGCUCGAGCAGCGACAA (SEQ ID NO: 6). Otras secuencias de ARNip específico de c-MAF incluyen, aunque sin limitación, CUUACCAGUGUGUUCACAA (SEQ ID NO: 7), UGGAAGACUACUACUGGAUG (SEQ ID NO: 8), AUUUGCAGUCAUGGAGAACC (SEQ ID NO: 9), CAAGGAGAAUACGAGAAGU (SEQ ID NO: 10), ACAAGGAGAAUACGAGAAG (SEQ ID NO: 11) y ACCUGGAAGACUACUACUGG (SEQ ID NO: 12).

Enzimas de ADN

Por otro lado, La divulgación también contempla el uso de enzimas de ADN para inhibir la expresión del gen c-MAF de la divulgación. Las enzimas de ADN incorporan algunas de las características mecánicas de las tecnologías tanto antisentido como de ribozima. Las enzimas de ADN están diseñadas de modo que reconocen una secuencia particular de ácido nucleico diana similar al oligonucleótido antisentido, no obstante, como la ribozima, son catalíticas y escinden específicamente el ácido nucleico diana.

Ribozimas

También se pueden usar moléculas de ribozima diseñadas para escindir catalíticamente productos de transcripción de un ARNm diana para impedir la traducción del ARNm que codifica c-MAF, cuya actividad se debe inhibir. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN. (Para una revisión, véase, Rossi, Current Biology 4: 469-471, 1994). El mecanismo de acción de la ribozima implica una hibridación específica de una secuencia de molécula de ribozima con un ARN diana complementario, seguida de un acontecimiento de escisión endonucleolítica. La composición de las moléculas de ribozima incluye preferentemente una o más secuencias complementarias al ARNm diana y la secuencia bien conocida responsable de la escisión del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5093246).

Las ribozimas usadas en la presente descripción incluyen ribozimas de cabeza de martillo, endorribonucleasa de ARN (en lo sucesivo "ribozimas de tipo Cech") (Zaug *et al.*, Science 224:574-578, 1984).

Las ribozimas pueden formarse mediante oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para mejorar la estabilidad, el direccionamiento, etc.) y deben distribuirse a las células que expresan el gen diana *in vivo*. Un método de distribución preferido implica el uso de una construcción de ADN que "codifica" la ribozima bajo el control de un promotor fuerte pol III o pol II constitutivo, de modo que las células transfectadas produzcan cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajeros diana endógenos e inhibir la traducción. Dado que las ribozimas son catalíticas, a diferencia de otras moléculas antisentido, se requiere una baja concentración intracelular para su eficiencia.

Anticuerpos inhibidores

En el contexto de la presente divulgación, "anticuerpo inhibidor" se entiende como cualquier anticuerpo capaz de unirse específicamente a la proteína c-MAF e inhibir una o más de las funciones de dicha proteína, preferentemente aquellas relacionadas con la transcripción. Los anticuerpos pueden prepararse usando cualquiera de los métodos que son conocidos por el experto en la materia, algunos de los cuales se han mencionado anteriormente. Por tanto, los anticuerpos policlonales se preparan por medio de la inmunización de un animal con la proteína a inhibir. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Kohler, Milstein *et al.* (Nature, 1975, 256:495). En el contexto de la presente divulgación, los anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos intactos que comprenden una región de unión a antígeno variable y una región constante, "Fab", "F(ab')₂" y "Fab'", Fv, fragmentos scFv, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos, alfacuerpos, ciclopéptidos y péptidos grapados. Una vez que se identifican los anticuerpos con capacidad de unión a la proteína c-MAF, se seleccionarán aquellos capaces de inhibir la actividad de esta proteína usando un ensayo de identificación de agentes inhibidores.

Péptidos inhibidores

Como se usa en el presente documento, la expresión "péptido inhibidor" se refiere a aquellos péptidos capaces de unirse a la proteína c-MAF e inhibir su actividad como se ha explicado anteriormente, es decir, impedir que c-MAF sea capaz de activar la transcripción génica.

Dominantes negativos de c-MAF

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

Como alternativa, los dominantes negativos de c-MAF incluyen variantes de c-MAF que mantienen la capacidad de dimerización con otras proteínas, pero carecen de la capacidad de activar la transcripción. Estas variantes son, por ejemplo, las que carecen del dominio de transactivación de c-MAF ubicado en el extremo N-terminal de la proteína. Por tanto, las variantes de dominantes negativos de c-MAF incluyen de manera ilustrativa las variantes en las cuales se han eliminado al menos los aminoácidos 1 a 122, al menos los aminoácidos 1-187 o al menos los aminoácidos 1 a 257 (considerando la numeración de c-MAF humano, como se describe en US6274338).

La divulgación contempla el uso tanto de las variantes de dominantes negativos de c-MAF como de los polinucleótidos que codifican c-MAF bajo el control operativo de un promotor adecuado para la expresión en células diana. Los promotores que pueden usarse para regular la transcripción polinucleotídica de la divulgación pueden ser promotores constitutivos, es decir, promotores que dirigen la transcripción a nivel basal, o promotores inducibles en los que la actividad transcripcional requiere una señal externa. Los promotores constitutivos adecuados para regular la transcripción son, entre otros, el promotor de CMV, el promotor SV40, el promotor DHFR, el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor del factor de alargamiento 1a (EFla), el promotor de albúmina, el promotor ApoA1, el promotor de queratina, el promotor CD3, el promotor de inmunoglobulina de cadena pesada o ligera, el promotor de neurofilamento, el promotor de enolasa específico de neuronas, el promotor L7, el promotor CD2, el promotor de cinasa de cadena ligera de la miosina, el promotor del gen HOX, el promotor de la timidina cinasa, el promotor de la ARN polimerasa II, el promotor del gen MyoD, el promotor del gen de la fosfogliceratocinasa (PGK), el promotor de la lipoproteína de baja densidad (LDL), el promotor del gen de la actina. En un aspecto preferido, el promotor que regula la expresión del transactivador es el promotor del gen PGK. En un aspecto preferido, el promotor que regula la transcripción polinucleotídica de la divulgación es el promotor de la ARN polimerasa del fago T7.

Preferentemente, los promotores inducibles que se pueden usar en el contexto de la presente divulgación son aquellos que responden a un agente inductor que muestra una expresión basal nula o despreciable en ausencia de un agente inductor y son capaces de promover la activación del gen situado en la posición 3'. Dependiendo del tipo de agente inductor, los promotores inducibles se clasifican como promotores de activación/desactivación de Tet (Gossen, M. and H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551; Gossen, M. *et al.*, 1995, Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. y H.M. Blau, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456); Promotores de activación/desactivación de pip (US 6287813); promotores dependientes de antiproggestina (US 2004132086), promotores dependientes de ecdisona (Christopherson *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89:6314-6318; No *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 93: 3346-3351, Suhr *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 95:7999-8004 y WO9738117), un promotor dependiente de la metalotioneína (WO8604920) y promotores dependientes de rapamicina (Rivera *et al.*, 1996, Nat. Med. 2:1028-32).

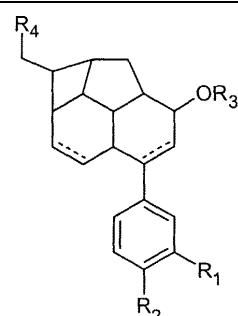
Los vectores adecuados para expresar el polinucleótido que codifica la variante dominante negativa de c-MAF incluyen vectores derivados de vectores de expresión procariotas tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus

derivados, mp18, mp29, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, fagos y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28, vectores de expresión en levaduras, tales como vectores de tipo plásmido de 2 micrones, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insecto tales como vectores de series pAC y vectores de series pVL, vectores de expresión en plantas tales como pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, vectores de la serie pORE y similares y basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados con adenovirus, así como retrovirus y particularmente lentivirus) vectores de expresión en células eucariotas superiores o vectores no virales tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL y pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1.

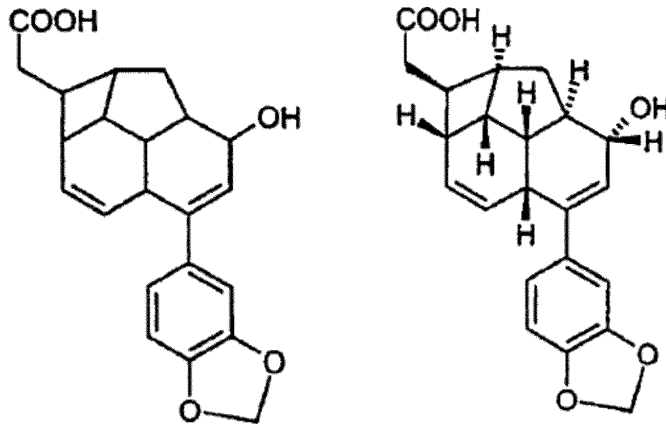
Otros compuestos inhibidores de la actividad de la proteína c-MAF

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

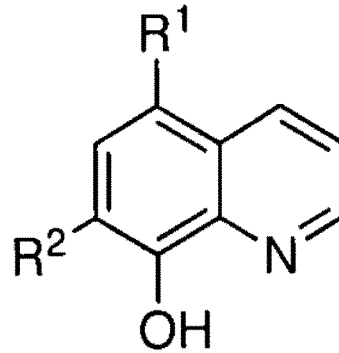
Tabla 1: Moléculas pequeñas con capacidad inhibidora de c-MAF

1	Derivados del ácido endiátrico H tales como los descritos en el documento WO2004014888 correspondientes a la fórmula general
	<div style="text-align: center;">  </div> <p>en la que R₁ y R₂ son, independientemente entre sí, 1.0 H o 2.0 un grupo O-alquilo C₁-C₆, -O-alquenilo C₂-C₆, -O-alquinilo C₂-C₆ o -O-arilo C₆-C₁₀, en el que alquilo, alquenilo y alquinilo son de cadena lineal o ramificada, y en el que los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo están mono- o disustituidos con: 2.1 -OH, 2.2 =O, 2.3 -O-alquilo C₁-C₆, en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada, 2.4 -O-alquenilo C₂-C₆, en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada, 2.5 arilo C₆-C₁₀, 2.6 -NH-alquilo C₁-C₆, en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada, 2.7 -NH-alquenilo C₂-C₆, en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada, 2.8 -NH₂ o 2.9 halógeno, y en el que el grupo arilo, está opcionalmente mono- o disustituido con el sustituyente 2.1 o 2.3 a 2.9, en el que los sustituyentes 2.3, 2.4, 2.6 y 2.7 pueden estar además sustituidos con funciones -CN, -amida u -oxima, y 2.5 puede estar sustituido adicionalmente con -CN o funciones amida, o R₁ y R₂ juntos forman un anillo, en el que R₁ y R₂ significa un grupo -O-[alqueno (C₁-C₆)]-O, R₃ es 1.0 H o 2.0 un grupo O-alquilo C₁-C₆, -O-alquenilo C₂-C₆, -O-alquinilo C₂-C₆ o -O-arilo C₆-C₁₀, en el que alquilo, alquenilo y alquinilo son de cadena lineal o ramificada, y en el que los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo están mono- o disustituidos con: 2.1 -OH, 2.2 =O, 2.3 -O-alquilo C₁-C₆, en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada, 2.4 -O-alquenilo C₂-C₆, en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada, 2.5 arilo C₆-C₁₀, 2.6 -NH-alquilo C₁-C₆, en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada, 2.7 -NH-alquenilo C₂-C₆, en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada, 2.8 -NH₂ o 2.9 halógeno, y en el que el grupo arilo, está opcionalmente mono- o disustituido con el sustituyente 2.1 o 2.3 a 2.9, en el que los sustituyentes 2.3, 2.4, 2.6 y 2.7 pueden estar además sustituidos con funciones -CN, -amida u -oxima, y 2.5 puede estar sustituido adicionalmente con -CN o funciones amida</p>

R₄ es CO₂R₃, CO₂NHR₃, CHO, CH₂OR₃, CH₂OSi(R₃)₃, CH₂Br, CH₂CN, en la que R₃ es como se ha definido anteriormente, y, en particular, los compuestos



II Derivados de 8-hidroxiquinolina tales como los descritos en el documento WO2009146546 de fórmula general



en la que

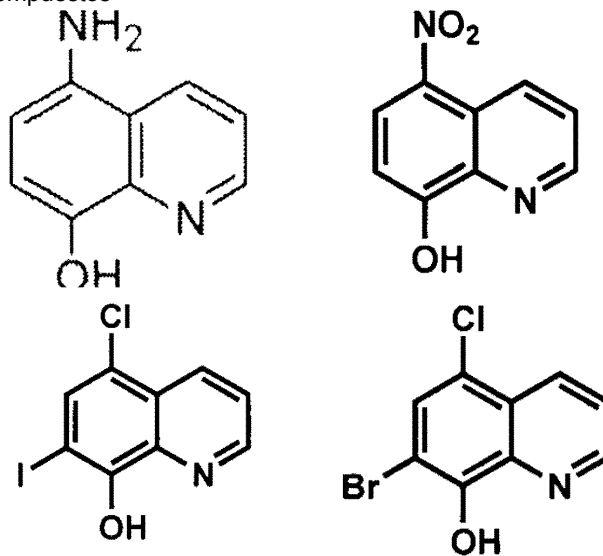
R₁ se selecciona del grupo que consiste en NO₂, NH₂, NH(alquilo C₁-C₆) y N(alquilo C₁-C₆)(alquilo C₁-C₆);

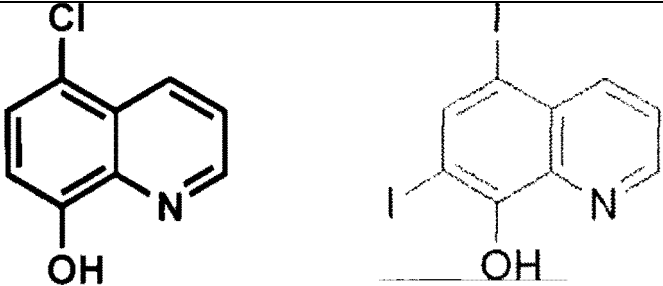
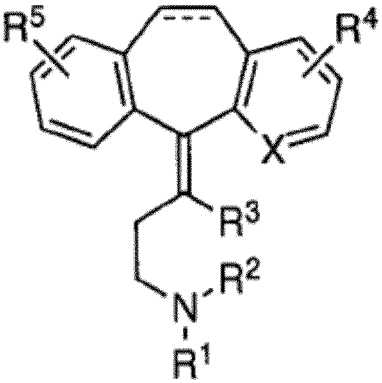
R₂ se selecciona de H, halógeno, alquilo C₁-C₆ y alquilo C₁-C₆ sustituido con flúor,

o

R₁ es Cl y R₂ es Br o H,

y, preferentemente, los compuestos



	
III	Clioquinol (5-cloro-7-yodoquinolin-8-ol) como se describe en el documento WO09049410
IV	<p>Compuestos como los descritos en el documento WO08098351 de fórmula general</p>  <p>en la que =-:-:- es un enlace sencillo o un enlace doble, R¹ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₄, C(O)O alquilo C₁-C₄, C(O) alquilo C₁-C₄ y C(O)NH alquilo C₁-C₄; R² se selecciona entre H y alquilo C₁-C₄; R³ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₄; o R² y R³ están unidos entre sí junto con los átomos de carbono y nitrógeno a los que están unidos para formar un anillo de piperidina, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente entre H, halógeno, hidroxilo, alquilo C₁-C₄, alquilo C₁-C₄ sustituido con flúor y alcoxi C₁-C₄; y X se selecciona entre C y N, Y compuestos preferidos tales como Ciproheptadina (clorhidrato de 4-(5H-dibenzo-[a,d]ciclohepten-5-ilideno)-1-metilpiperidina), Amitriptilina (3-(10,11-dihidro-5H-dibenzo [[a,d]]ciclohepteno-5-ilideno)-N,N-dimetil-1-propanamina), Loratadina (4-(8-cloro-5,6-dihidro-11H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridin-11-ilideno)-1-piperidinacarboxilato de etilo, Ciclobenzapina (3-(5H)-dibenzo[a,d]ciclohepten-5-ilideno)-N,N-dimetil-1-propanamina).</p>
V	Nivalenol (12,13-epoxi-3,4,7,15-tetrahidroxitricotec-9-en-8-ona) como se describe en el documento WO0359249

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

5

Tabla 2: inhibidores de c-MAF

Antagonista	Referencia para actividad inhibidora de cdk2
Análogos de purina	
Purvalanoles tales como 2-(1R-Isopropil-2-hidroxietilamino)-6-(3-cloroanilino)-9-isopropilpurina que tiene una fórmula molecular C ₁₉ H ₂₅ ClN ₆ O disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial Purvalanol A (# P4484, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), Purvalanol B, aminopurvalanol, compuesto 52 (donde el isopropilo de purvalanol A se sustituye por H)	Gray, N.S. <i>et al.</i> , Science, 281, 533-538 (1998); Chang, Y.T. <i>et al.</i> , Chem. Biol., 6, 361-375(1999).

Antagonista	Referencia para actividad inhibidora de cdk2
2-(Hidroxietilamino)-6-bencilamino-9-metilpurina que tiene una fórmula molecular $C_{15}H_{18}N_6O$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial Olomoucine (#O0886), 2-(2'-hidroxietilamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina que tiene una fórmula molecular $C_{17}H_{22}N_6O$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial N'-isopropilolomoucina (#I0763); CVT-313	Vesely, J., <i>et al.</i> , (1994) Eur. J. Biochem., 22 771-86, 11; Brooks, E.E., <i>et al.</i> , (1997) J. Biol. Chem., 272, 29207-11
6-(Bencilamino)-2(R)-[[1-(hidroximetil)propil]amino]-9-isopropilpurina 2-(R)-[[9-(1-metiletil)-6-[[fenilmetil]amino]-9H-purin-2-il]amino]-1-butanol que tiene una fórmula molecular de $C_{19}H_{26}N_6O$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial de Roscovitine (# R7772), metoxiroscovitina	Wan; D. <i>et al.</i> , J. Virol., 75, 7266-7279 (2001); McClue, S.J. <i>et al.</i> , Int. J. Cancer, 102, 463-468 (2002); Meijer, L., <i>et al.</i> , (1997) Eur. J. Biochem., 243, 527-36
El análogo de purina N2-(cis-2-aminociclohexil)-N6-(3-clorofenil)-9-etil-9H-purina-2,6-diamina que tiene una fórmula molecular de $C_{19}H_{24}ClN_7$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial CGP74514 (#C3353)	Imbach, P. <i>et al.</i> , Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 44, 524-530(2001).
CGP79807, un análogo de purina de CGP74514 (visto anteriormente) donde Cl se sustituye con CN, se elimina OH y la posición orto del anillo de ciclohexano es NH_2	Imbach. P. <i>et al.</i> , Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 44, 524-530(2001).
análogo de purina tal como O6-ciclohexilmetil guanina NU2058	Arris, C.E. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000);
	Davies <i>et al.</i> , <i>Nature Structural Biology</i> , 9:10, 745-749, 2002
análogo de purina tal como NU6102	Arris, C.E. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000); Davies, T.G. <i>et al.</i> , <i>Nat. Struct. Biol.</i> , 9, 745-749 (2002).
isopentenil-adenina	Vesely, J., <i>et al.</i> , (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86
Agentes no basados en purina	
Indirrubinas tales como indirrubin-3'-monoxima que tienen una fórmula molecular de $C_{16}H_{11}N_3O_2$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial (#I0404), 5-sulfonato de indirrubina, 5-cloro indirrubina	Davies, T.G. <i>et al.</i> , <i>Structure</i> , 9, 389-397 (2001); Marko, D. <i>et al.</i> , <i>Br. J. Cancer</i> , 84, 283-289 (2001); Hoessel, R., <i>et al.</i> , (1999) <i>Nat. Cell Biol.</i> , 1, 60-7; PCT/US02/30059 de Hellberg <i>et al.</i> , publicada como WO 03/027275.
Oxindol 1 de Fischer como se hace referencia en la columna 2 de esta tabla, (#N118, JMAR Chemical,	Porcs-Makkay, M., <i>et al.</i> , <i>Tetrahedron</i> 2000, 56, 5893; <i>Org. Process Res. Dev.</i> 2000, 4, 10
Indenopirazoles	Nugiel, D.A. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 44, 1334-1336 (2001); Nugiel, D.A. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 45, 5224-5232 (2002); Yue, E.W. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 45, 5233-5248(2002).
Pirido(2,3-d)pirimidina-7-onas, compuesto 3 de Fischer	Barvian, M. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 43, 4606-4616 (2000); Toogood, P.L., <i>Med. Res. Rev.</i> , 21, 487-498(2001).
Quinazolininas tales como anilinoquinazolina	Sielecki, T.M. <i>et al.</i> , <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 11, 1157-1160(2001); Mettey <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> 2003, 46, 222-236.

Antagonista	Referencia para actividad inhibidora de cdk2
Tiazoles tales como tiazol fusionado, 4-[[7-oxo-6,7-dihidro-8H-[1,3]tiazolo[5,4-e]indol-8-ilideno)metil]amino)-N-(2-piridil)bencenosulfonamida que tiene una fórmula molecular de C ₂₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S ₂ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial GW8510 (#G7791)	Davis, ST. <i>et al.</i> , Science, 291, 134-137 (2001); PCT/US02/30059 de Hellberg <i>et al.</i> , publicada como WO 03/027275.
Flavopiridoles tales como flavopiridol (L86 8275; NCS 649890, National Cancer Institute, Bethesda, MD) y un derivado de decloro	Carlson, B.A., <i>et al.</i> , (1996) Cancer Res., 56, 2973-8
Alcaloides tales como estaurosporina (#S1016, A.G, Scientific, San Diego, CA) o UCN-01 (7-hidroxiestaurosporina) National Cancer Institute, Bethesda, MD	Rialel, V., <i>et al.</i> , (1991) Anticancer Res., 11, 1581-90; Wang, Q., <i>et al.</i> , (1995) Cell Growth Differ., 6, 927-36, Akiyama, T., <i>et al.</i> , (1997) Cancer Res., 57, 1495-501, Kawakami, K., <i>et al.</i> , (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., 219, 778-83
Paulonas tales como 9-bromo-7,12-dihidro-indolo[3,2-d][1]benzacepin-6(5H)-ona que tiene una fórmula molecular de C ₁₆ H ₁₁ BrN ₂ O disponible de Sigma-Aldrich bajo el nombre comercial de kenpaulone (#K3888), o 9-Nitro-7,12-dihidroindolo-[3,2-d][1]benzacepin-6(5)-ona que tiene una fórmula molecular de C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₃ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial de alsterpaulone (#A4847)	Zaharevitz, D.W. <i>et al.</i> , Cancer Res., 59, 2566-2569 (1999); Schultz, C. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 42, 2909-2919 (1999); Zaharevitz, D.W., <i>et al.</i> , (1999) Cancer Res., 59, 2566-9; PCT/US02/30059 de Hellberg <i>et al.</i> , publicada como WO 03/027275.
CGP 41251, un alcaloide	Begemann, M., <i>et al.</i> , (1998) Anticancer Res., 18, 2275-82;
	Fabbro <i>et al.</i> , <i>Pharmacol Ther.</i> mayo-junio de 1999;82(2-3):293-301
Himendialdisinas tales como 10z-himendialdisina que tiene una fórmula molecular de C ₁₁ H ₁₀ BrN ₅ O ₂ disponible de Biochemicals.net, una división de A.G. Scientific, Inc. (San Diego, CA) (H-1150)	Meijer, L., <i>et al.</i> , (1999) Chemistry & Biology, 7, 51-63; PCT/CS02/30059 de Hellberg <i>et al.</i> , publicada como WO 03/027275.
CGP60474, una fenilaminopirimidina	21; WO95/09853, Zimmermann <i>et al.</i> , 21 de septiembre de 1994
Tiazolopirimidina 2	Attaby <i>et al.</i> , <i>Z. Naturforsch.</i> 54b, 788-798 (1999)
Diarilurea	Honma, T. <i>et al.</i> , <i>S. Med. Chem.</i> , 44, 4628-4640 (2001), Honma, T. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 44, 4615-4627(2001).
Éster metílico del ácido (2R)-2,5-dihidro-4-hidroxi-2-[(4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)fenil)metil]-3-(4-hidroxifenil)-5-oxo-2-furancarboxílico que tiene una fórmula molecular de C ₂₄ H ₂₄ O ₇ disponible de Sigma-Aldrich con la marca comercial Butyrolactone-I (B7930)	Kitagawa, M. <i>et al.</i> , <i>Oncogene</i> , 8, 2425-2432(1993).
Aloisine A, No. de Cat, 128125 (Calbiochem, San Diego, CA)	Mettey <i>et al.</i> , <i>J. Med, Chem</i> , 2003, 46, 222-236

En un aspecto preferido, Los agentes inhibidores de c-MAF se usan para el tratamiento y/o prevención de metástasis ósea. En un aspecto aún más preferido, la metástasis ósea es metástasis osteolítica.

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

El término "vehículo" se refiere a un diluyente o excipiente con el que se administra el principio activo. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceite, incluyendo aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se usan preferentemente como vehículos agua o soluciones acuosas de solución salina y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin, 1995. Preferentemente, los

vehículos de la invención están aprobados por la agencia reguladora de un gobierno estatal o federal o están enumerados en la Farmacopea Estadounidense u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

5 Los vehículos y las sustancias auxiliares necesarios para fabricar la forma de dosificación farmacéutica deseada de la composición farmacéutica de la divulgación dependerán, entre otros factores, de la forma de dosificación farmacéutica elegida. Dichas formas de dosificación farmacéutica de la composición farmacéutica se fabricarán de acuerdo con los métodos convencionales conocidos por el experto en la materia. En el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. Edición de 1993, se puede encontrar una revisión de los diferentes métodos para administrar los principios activos, los excipientes a usar y los procesos para producirlos. Los ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o composición líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. Además, la composición farmacéutica puede contener, según se considere necesario, estabilizantes, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares.

15 Para su uso en medicina, los agentes inhibidores de c-MAF pueden encontrarse en forma de profármaco, sal, solvato o clatrato, bien de forma aislada o bien en combinación con agentes activos adicionales y pueden ser formuladas conjuntamente con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Excipientes preferidos para su uso en la presente divulgación incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. En un aspecto particular, la composición farmacéutica desvelada se formulará en una forma de dosificación farmacéutica sólida (por ejemplo comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas etc.), forma de dosificación farmacéutica líquida (por ejemplo soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, pomadas etc.) o forma de dosificación farmacéutica semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). Las composiciones farmacéuticas desveladas pueden administrarse por cualquier vía, incluyendo, aunque sin limitarse a, la vía oral, la vía intravenosa, la vía intramuscular, la vía intraarterial, la vía intramedular, la vía intratecal, la vía intraventricular, la vía transdérmica, la vía subcutánea, la vía intraperitoneal, la vía intranasal, la vía entérica, la vía tópica, la vía sublingual o la vía rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a usar y de sus procesos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A., Edición de 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, EE. UU., (2000). Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

35 En el caso de que se administren ácidos nucleicos (ARNip, polinucleótidos que codifican ARNip o ARNhc o polinucleótidos que codifican dominantes negativos de c-MAF), la divulgación contempla composiciones farmacéuticas particularmente preparadas para administrar dichos ácidos nucleicos. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender dichos ácidos nucleicos desnudos, es decir, en ausencia de compuestos que protejan a los ácidos nucleicos de la degradación por las nucleasas del cuerpo, lo que conlleva la ventaja de que se elimina la toxicidad asociada con los reactivos usados para la transfección. Las vías de administración adecuadas para los compuestos desnudos incluyen la vía intravascular, la vía intratumoral, la vía intracraneal, la vía intraperitoneal, la vía intrapléica, la vía intramuscular, la vía subretiniana, la vía subcutánea, la vía mucosa, la vía tópica y la vía oral (Templeton, 2002, DNA Cell Biol., 21:857-867). Como alternativa, los ácidos nucleicos pueden administrarse formando parte de liposomas conjugados con colesterol o conjugados con compuestos capaces de promover la translocación a través de membranas celulares tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT del VIH-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simple, oligómeros y péptidos de arginina como se describe en el documento WO07069090 (Lindgren, A. *et al.*, 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:99-103, Schwarze, S.R. *et al.*, 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:45-48, Lundberg, M *et al.*, 2003, Mol Therapy 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, Pharm. Res. 21:389-393). Como alternativa, el polinucleótido se puede administrar formando parte de un vector plasmídico o vector viral, preferentemente vectores basados en adenovirus, en virus adeno-asociados o en retrovirus tales como virus basados en el virus de la leucemia murina (VLM) o en lentivirus (VIH, VIF, VAIE).

55 Los agentes inhibidores de c-MAF o las composiciones farmacéuticas que los contienen se pueden administrar en dosis de menos de 10 mg por kilogramo de peso corporal, preferentemente menos de 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005 o 0.00001 mg por cada kg de peso corporal. La dosis unitaria se puede administrar por inyección, por inhalación o por administración tópica.

60 La dosis depende de la gravedad y la respuesta de la afección a tratar y puede variar entre varios días y meses o hasta que la afección desaparezca. La dosis óptima puede determinarse midiendo periódicamente las concentraciones del agente en el cuerpo del paciente. La dosis óptima se puede determinar a partir de los valores de CE50 obtenidos por medio de ensayos previos *in vitro* o *in vivo* en modelos animales. La dosis unitaria se puede administrar una vez al día o menos de una vez al día, preferentemente menos de una vez cada 2, 4, 8 o 30 días. Como alternativa, es posible administrar una dosis inicial seguida de una o varias dosis de mantenimiento, generalmente de una cantidad menor que la dosis inicial. El régimen de mantenimiento puede implicar tratar al

paciente con una dosis que oscile entre 0,01 µg y 1,4 mg/kg de peso corporal por día, por ejemplo, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 o 0,00001 mg por kg de peso corporal por día. Las dosis de mantenimiento se administran preferentemente una vez cada 5, 10 o 30 días. El tratamiento debe continuarse durante un tiempo que variará de acuerdo con el tipo de trastorno que sufra el paciente, la gravedad del mismo y el estado del paciente. Después del tratamiento, se debe supervisar la evolución del paciente para determinar si la dosis debe aumentarse en caso de que la enfermedad no responda al tratamiento o se reduzca la dosis si se observa una mejoría de la enfermedad o si se observan efectos secundarios no deseados.

Tratamiento o prevención de la degradación ósea en pacientes con cáncer de pulmón con metástasis ósea que tienen niveles elevados de c-MAF

Los inventores de la presente invención han determinado que los niveles de c-MAF están elevados en metástasis y, en un aspecto preferido, metástasis ósea. Los pacientes que padecen cáncer de pulmón que ha metastatizado en el hueso y en los que hay niveles elevados de c-MAF en dicha metástasis pueden beneficiarse particularmente de terapias dirigidas a prevenir la degradación ósea causada por el aumento de la actividad osteoclástica.

Por tanto, en otro aspecto, se desvela el uso de un agente para evitar o prevenir la degradación ósea en la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de pulmón y que tiene niveles elevados de MAF en una muestra de tejido tumoral metastásico con respecto a una muestra de control.

Como alternativa, se desvela un agente para evitar o prevenir la degradación ósea para uso en la prevención y/o el tratamiento de la metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de pulmón y tiene niveles elevados de MAF en una muestra de tejido tumoral metastásico con respecto a una muestra de control.

Como alternativa, se desvela un método de prevención y/o tratamiento de la degradación en un sujeto que padece cáncer de pulmón y tiene niveles elevados de MAF en una muestra de tejido tumoral metastásico con respecto a una muestra de control, que comprende administrar un agente para evitar o prevenir la degradación ósea a dicho sujeto.

En un aspecto particular, la metástasis ósea es metástasis osteolítica. En otro aspecto particular, el cáncer de pulmón es NSCLC.

Los términos y expresiones "sujeto", "cáncer de pulmón", "muestra de tumor", "metástasis", "gen c-MAF", "niveles de expresión aumentados" y "muestra de control" se han descrito en detalle en relación con el primer método desvelado y son igualmente aplicables al agente para evitar o prevenir la degradación ósea.

Los agentes capaces de evitar o prevenir la degradación ósea adecuados para el método terapéutico descrito en la presente divulgación se han descrito en detalle anteriormente en el contexto del método de terapia personalizada.

La muestra de referencia o de control es una muestra de tumor de un sujeto con cáncer de pulmón que no ha experimentado metástasis o que corresponde al valor mediano de los niveles de expresión del gen c-MAF medidos en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de pulmón que no han experimentado metástasis.

Los métodos para determinar o cuantificar si los niveles de c-MAF están elevados con respecto a una muestra de control se han descrito en detalle en relación con el primer método descrito y son igualmente aplicables al agente para evitar o prevenir la degradación ósea.

Como alternativa, se puede llevar a cabo un tratamiento combinado, en el que más de un agente para evitar o prevenir la degradación ósea de los mencionados anteriormente se combinan para tratar y/o prevenir la metástasis o dichos agentes se pueden combinar con otros suplementos, tales como calcio o vitamina D o con una hormona.

Los agentes para evitar o prevenir la degradación ósea se administran normalmente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo" y los tipos de vehículos se han definido anteriormente para el agente inhibidor de c-MAF, así como la forma y la dosis en que se pueden administrar y son igualmente aplicables al agente para evitar o prevenir la degradación ósea.

Kits

En otro aspecto, se desvela un kit para predecir metástasis ósea de un cáncer de pulmón, en un sujeto que padece dicho cáncer, comprendiendo el kit: a) medios para cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en una muestra de dicho sujeto; y b) medios para comparar el nivel cuantificado de expresión de c-MAF en dicha muestra con un nivel de expresión de c-MAF de referencia.

En otro aspecto, se desvela un kit para predecir el desenlace clínico de un sujeto que padece metástasis ósea de un cáncer de pulmón, comprendiendo el kit: a) medios para cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en una muestra

de dicho sujeto; y b) medios para comparar el nivel cuantificado de expresión de c-MAF en dicha muestra con un nivel de expresión de c-MAF de referencia.

5 En otro aspecto se desvela un kit para determinar una terapia para un sujeto que padece cáncer de pulmón, comprendiendo el kit: a) medios para cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en una muestra de dicho sujeto; b) medios para comparar el nivel cuantificado de expresión de c-MAF en dicha muestra con un nivel de expresión de c-MAF de referencia; y c) medios para determinar una terapia para prevenir y/o reducir la metástasis ósea en dicho sujeto basándose en la comparación del nivel de expresión cuantificado con el nivel de expresión de referencia, d) 10 medios para excluir una terapia para prevenir y/o reducir la metástasis ósea en dicho sujeto basándose en la comparación del nivel de expresión cuantificado con el nivel de expresión de referencia.

15 En otro aspecto, se desvela un kit que comprende: i) un reactivo para cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en una muestra de un sujeto que padece cáncer de pulmón, y ii) uno o más índices de nivel de expresión del gen c-MAF que han sido predeterminados para correlacionarlos con el riesgo de metástasis ósea.

Los medios para cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en una muestra de dicho sujeto se han descrito previamente en detalle, incluyendo la amplificación y translocación del locus 16q23 y 16q22-24.

20 En un aspecto preferido, los medios para cuantificar la expresión comprenden un conjunto de sondas y/o cebadores que se unen específicamente a y/o amplifican el gen c-MAF.

En un aspecto particular, el cáncer de pulmón es cáncer SCLC o NSCLC.

25 En un aspecto particular, el kit se aplica, aunque sin limitación, a una biopsia de cáncer de pulmón, a una célula de cáncer de pulmón circulante, a un ADN de tumor de pulmón circulante.

Todas las realizaciones y aspectos particulares de los métodos de la presente divulgación son aplicables a los kits desvelados y a sus usos.

30 Método para tipar una muestra de un sujeto que padece cáncer de pulmón.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para tipar una muestra de un sujeto que padece cáncer de pulmón, comprendiendo el método:

35 a) proporcionar una muestra de dicho sujeto;
b) cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en dicha muestra;
c) tipar dicha muestra comparando el nivel de expresión cuantificado de c-MAF con un nivel de referencia predeterminado de expresión de c-MAF;
40 en el que dicho tipado proporciona información de pronóstico relacionada con el riesgo de metástasis ósea en dicho sujeto, en el que si el nivel de expresión de dicho gen aumenta con respecto al nivel de expresión de dicho gen en la muestra de control, entonces dicho sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis.

45 Los medios para cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en una muestra de dicho sujeto se han descrito previamente en detalle, incluyendo la amplificación y translocación del locus 16q23 y 16q22-24. En una realización particular, el cáncer de pulmón es SCLC o NSCLC. En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral, una célula tumoral circulante o un ADN tumoral circulante.

50 Método para clasificar un sujeto que padece cáncer de pulmón

55 En otro aspecto, se desvela un método para clasificar un sujeto que padece cáncer de pulmón en una cohorte, que comprende: a) determinar el nivel de expresión de c-MAF en una muestra de dicho sujeto; b) comparar el nivel de expresión de c-MAF en dicha muestra con un nivel de referencia predeterminado de expresión de c-MAF; y c) clasificar dicho sujeto en una cohorte basándose en dicho nivel de expresión de c-MAF en la muestra.

Los medios para cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en una muestra de dicho sujeto se han descrito previamente en detalle, incluyendo la amplificación y translocación del locus 16q23 y 16q22-24.

60 En un aspecto particular, el cáncer de pulmón es un SCLC o un NSCLC. En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral, una célula tumoral circulante o un ADN circulante. En un aspecto preferido, dicha cohorte comprende al menos otro individuo al que se le ha determinado que tiene un nivel de expresión comparable de c-MAF en comparación con dicho nivel de expresión de referencia. En otro aspecto preferido, dicho nivel de expresión de c-MAF en dicha muestra aumenta en relación con dicho nivel de referencia predeterminado, y en el que los miembros de la cohorte se clasifican como que tienen un mayor riesgo de metástasis ósea. En otro aspecto 65 preferido, dicha cohorte es para llevar a cabo un ensayo clínico. En un aspecto preferido, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no limitan el alcance de la misma.

Ejemplos

5 **Ejemplo 1**

Relevancia clínica y valor de pronóstico de c-MAF y 16q22-24 para identificar pacientes en riesgo de metástasis, en particular metástasis ósea

10 c-MAF se ensayó en diferentes cohortes de muestras de pacientes con cáncer de pulmón. La primera incluye los perfiles de expresión génica y las anotaciones clínicas para metástasis que contienen el transcriptoma de los tumores primarios de cáncer de pulmón y una segunda cohorte basada en biopsias de tumores de pulmón en forma de una micromatriz de tejido y las anotaciones clínicas sobre el tiempo hasta la metástasis ósea y la supervivencia global. Estos tumores son representativos de todos los subtipos y estadios del cáncer de pulmón. En la primera
 15 cohorte, la expresión del gen c-MAF se correlaciona con los parámetros clínicos que incluyen el tiempo hasta la metástasis. De manera similar, el segundo conjunto (n=74) de biopsias de tumores primarios de pulmón para las cuales se usó la anotación clínica de la recaída ósea y la supervivencia global después del diagnóstico de tumores primarios para determinar los niveles de expresión de la proteína c-MAF y la ganancia genómica 16q23 por inmunohistoquímica e la hibridación in situ fluorescente usando un anticuerpo específico para c-MAF y una sonda
 20 FISH específica para el locus c-MAF, y se establece la asociación entre los niveles de expresión de c-MAF y la ganancia genómica de 16q23 y el riesgo de recaída ósea.

Explicación detallada:

25 Cohorte de pacientes I

Se realizó el análisis estadístico apropiado para ver si la expresión de MAF en estos tumores se correlaciona con la metástasis. Se usó una cohorte de tumores primarios de pulmón, incluidos los mutantes EGFR y KRAS y SCLC y NSCLC. La información de los pacientes fue extraída de:

30 Chitale D, Gong Y, Taylor BS, Broderick S, Brennan C, Somwar R, Golas B, Wang L, Motoi N, Szoke J, Reinersman JM, Major J, Sander C, Seshan VE, Zakowski MF, Rusch V, Pao W, Gerald W, Ladanyi M. "An integrated genomic analysis of lung cancer reveals loss of DUSP4 in EGFR-mutant tumors." Oncogene. 2009; 28: 2773-83.

Todos los análisis estadísticos se realizaron en R usando Bioconductor (Gentleman et al. (2004)).

35 Se ajustaron los modelos de riesgos proporcionales de Cox (usando la función R coxph de Packaged survival) para ver si se podía explicar el fenotipo de metástasis a través de la expresión MAF. C-MAF tuvo un efecto estadísticamente significativo (usando tres sondas independientes específicas para c-MAF en matrices de affymetrix). La expresión génica de c-MAF en tumores primarios de pulmón se correlacionó significativamente con la metástasis como se observó en el gráfico de Kaplan Meier y se destaca por el CRI y el valor p obtenidos (figura 1).
 40 Cohorte de pacientes II

De manera similar, se garantiza un conjunto de datos de (74) tumores primarios de pulmón para los cuales la anotación clínica de recaída ósea posterior al diagnóstico de tumor primario está disponible, los niveles de c-MAF se determinan mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo específico de c-MAF y se establece la asociación
 45 entre los niveles de la expresión de c-MAF y el riesgo de recaída ósea. Las muestras del segundo tejido tumoral primario incluido en parafina de pacientes con cáncer de pulmón. Estas muestras fueron recogidas por el Instituto de Oncología Vall d'Hebron durante su práctica clínica junto con los datos clínicos relevantes necesarios y la aprobación del comité clínico.

50 Las muestras que fueron seleccionadas cumplen con los siguientes requisitos:

9 muestras pertenecían a pacientes con enfermedad local (M0) en el momento del diagnóstico con una recaída ósea confirmada en cualquier momento del seguimiento.

55 49 muestras pertenecían a pacientes en el momento del diagnóstico que permanecen libres de metástasis después de al menos 5 años.

Los 16 tumores restantes provienen de pacientes M0 en el momento del diagnóstico que tuvieron una recaída en cualquier ubicación que no fuera hueso.

60 **Ejemplo 2**

La expresión del gen c-MAF está asociada con el riesgo de metástasis, en particular metástasis ósea, en cáncer de pulmón.

65 La expresión de los genes de metástasis óseas de c-MAF se correlacionó con los parámetros clínicos, incluida la

metástasis, usando el conjunto de datos de expresión de cáncer de pulmón descrito anteriormente. Como se describe en la figura 1, la expresión de c-MAF se asoció con un alto riesgo de metástasis. Siguiendo un análisis estadístico estándar, se demostró que la expresión de MAF en estos tumores se correlaciona significativamente con la metástasis. Se usó una cohorte de tumores primarios de pulmón, incluidos los mutantes EGFR y KRAS y SCLC y NSCLC. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando Bioconductor (Gentleman et al. (2004)).

Los modelos de riesgos proporcionales de Cox se ajustaron (usando la función R coxph de Packaged survival) para ver si se podía explicar el fenotipo de metástasis a través de la expresión de MAF. C-MAF tuvo un efecto estadísticamente significativo (usando tres sondas independientes específicas para c-MAF en matrices de affymetrix). La expresión génica de c-MAF en tumores primarios de pulmón se correlacionaba significativamente con la metástasis como se observa en el gráfico de Kaplan Meier y se destaca por el CRI y el valor p obtenidos (figura 1). Los tumores se clasificaron de acuerdo con tres grupos de expresión de c-MAF, alta (> +1 desviación estándar de la media), media (<+1 desviación estándar de la media y > -1 desviación estándar de la media) y baja (<-1 desviación estándar de la media).

Ejemplo 3:

La expresión de c-MAF está asociada con el riesgo de metástasis ósea.

Análisis por inmunohistoquímica

La inmunotinción de cMAF se realizó en portaobjetos de vidrio cargados en una plataforma Dako Link. Después de la desparafinación, se realizó la recuperación del antígeno. La peroxidasa endógena se extingue. Se usó un anticuerpo anti-c-MAF, seguido de incubación con un anticuerpo secundario acoplado con peroxidasa. La inmunotinción de C-MAF se puntúa mediante una medición computarizada.

Valor de pronóstico y predictivo de c-MAF para metástasis y metástasis ósea en cáncer de pulmón

Se evaluó el valor de pronóstico y predictivo de la expresión de c-MAF para la metástasis del cáncer de pulmón. Los niveles de proteína C-MAF se determinaron mediante inmunohistoquímica (IHC). La inmunotinción de MAF se puntuó mediante una medición computarizada. Se adquirieron nueve imágenes representativas de cada muestra a intervalos de longitud de onda de 10 nm entre 420 y 700 nm, usando un microscopio Leica DM2000 equipado con el sistema de adquisición de imágenes multiespectrales Nuance FX (CRI, Inc.). Antes de adquirir un conjunto de datos espectrales de una imagen, se realizó una rutina de exposición automática mientras se tomaba una imagen de un área en blanco de portaobjetos para determinar el tiempo de exposición necesario para llenar aproximadamente los 90 % de los pocillos del dispositivo en cada longitud de onda para compensar las variaciones de la intensidad de la fuente, la eficiencia de transmisión del filtro y la sensibilidad de la cámara. Se creó una biblioteca de colores de colorante DAB y hematoxilina puros y se usó para mezclar los colores con el software Nuance 1.6.4. A continuación se adquirió un cubo (pila de imágenes tomadas en las diferentes longitudes de onda) de referencia para cada nuevo caso, seguido de imágenes espectrales de tres campos de tejidos representativos usando los mismos tiempos de exposición. Después de la deconvolución de las imágenes, los datos espectrales se sometieron a corrección de campo plano para compensar la irregularidad en la iluminación y se filtró el fondo. Las señales positivas se convirtieron de unidades de transmisión a unidades de densidad óptica tomando el registro negativo de la relación de la muestra dividida por el cubo de referencia usando una conversión de la ley de Beer. Se estableció un umbral asistido por ordenador, que crea una imagen en pseudo-color que resalta todas las señales positivas. El análisis produjo datos cuantitativos de c-MAF a partir de la intensidad promedio de las regiones de interés. Solo los núcleos de las células epiteliales (normales y malignas), pero no las células estromales o los linfocitos, se detectaron automáticamente al establecer un umbral de tamaño distinto y esto lo confirmó un patólogo. Cada caso se calculó para el valor medio de la intensidad de la señal de todas las regiones de interés para el análisis estadístico. La salida de la medición computarizada produjo datos continuos que van desde 1160 a 99760 unidades de densidad óptica (D.O.) para la expresión de c-MAF. El valor de corte (20000 D.O.) para una expresión alta y baja se determinó en función de una curva operativa del receptor según los procedimientos estándar (AUC 0,802). Los resultados se resumen en la tabla 3.

		Tabla 3	
		Metástasis ósea	
		NO	Sí
	<=20.000 DO	61	2
c-MAF	>20.000 DO	4	7

Basándose en estos valores, la oportunidad relativa de sufrir metástasis ósea en el grupo con alto c-MAF frente al bajo fue OR (metástasis ósea en cualquier momento) = 53,37 (95 % C.I. 8.24-345.92)

A continuación se confirmó el tiempo hasta la progresión ósea de la población general del estudio (figura 2a) y después se evaluó la probabilidad de metástasis ósea en cualquier momento sin supervivencia de los dos grupos (figura 2b). Curiosamente, en la cohorte de estudio, los tumores con alta expresión de c-MAF tienen una supervivencia global más pequeña que los que expresan niveles bajos.

5 Basándose en la segunda cohorte analizada, se extrajeron las características clínicas de diagnóstico. La expresión de alto nivel de C-MAF predice metástasis óseas con una sensibilidad de 0,778, una especificidad de 0,938, un valor predictivo positivo del 63,6 % y un valor predictivo negativo del 96,8 %.

10 La expresión del gen o proteína c-MAF en tumores de pulmón se correlaciona significativamente con la metástasis y la metástasis ósea en cualquier momento.

Ejemplo 4

15 La amplificación del cromosoma 16q22-q24 (incluye el gen c-MAF) predice y es un indicador de pronóstico del riesgo de metástasis, en particular metástasis ósea, en cáncer de pulmón.

20 A continuación, se determinó si una ganancia en chr16q22-q24, que incluye el locus del gen c-MAF, está asociada con el riesgo de metástasis ósea en pacientes con cáncer de pulmón. Para este fin, se usó una sonda de hibridación in situ de fluorescencia dual (FISH) 16q23 14q32 que identifica las amplificaciones de chr16q22-q24 para medir el número de copias de la región 16q22-24. La sonda 14q32 también se usó para normalizar la poliploidía tumoral.

25 Se evaluó el valor de pronóstico y predictivo de la asociación de ganancia de la CNA de 16q22-24 con metástasis ósea en cáncer de pulmón. Las copias 16q23 y 14q32 fueron determinadas por FISH. Los portaobjetos se incubaron con mezcla de sondas 16q23 MAF y 14q32IGH. Esta sonda SpectrumOrange flanquea la región del gen MAF y está compuesta por dos segmentos que tienen, cada uno, aproximadamente 350 kb con un espacio de aproximadamente 2,2 Mb. El segmento centromérico está situado en chr16:75729985-76079705 (conjunto de marzo de 2006, UCSC Genome Browser) y el segmento telomérico está ubicado en chr16:78290003-78635873 (conjunto de marzo de 2006, UCSC Genome Browser). Esta sonda flanquea cinco genes VAT1L, CLEC3A, WWOX, 5srRNA y MAF (ordenados desde el centrómero hasta el telómero). En paralelo, se usó una sonda CEP16 (chr 16 centromérica) (Abbot) para determinar la CNA. Se usó la sonda CEP16 (16q11.2) (Abbot) para puntuar la CNA de 16q23. Se aplicó una contratinción de DAPI y se adquirieron imágenes con un microscopio de fluorescencia.

35 Los resultados se resumen en las tablas 4 y 5.

Tabla 4: Un tumor será positivo para una ganancia de 16q22-24 basándose en un valor de corte \geq a 2,5 copias del 16q23

		Metástasis ósea	
		NO	Sí
16q23	$\leq 2,5$	13	9
FISH	$> 2,5$	44	0

40 Tabla 5: Un tumor será positivo para una ganancia de CNA de 16q22-24 basándose en un valor de corte \geq a 1,5 copias del 16q23 normalizado por el número de copias del 14q23.

		Metástasis ósea	
		NO	Sí
16q23	$\leq 1,5$	4	9
CNA	$> 1,5$	53	0

45 Basándose en estos valores, se calculó la oportunidad relativa de riesgo de experimentar metástasis ósea en el grupo de ganancia de 16q22-24 o ganancia de CNA positiva frente a la negativa. Dado que no hubo pacientes con metástasis ósea que obtuvieran una puntuación negativa para la determinación y con el fin de evitar errores en la estimación, según los procedimientos estadísticos estándar (Glas, A.S. *et al.*, 2003, Journal of Clinical Epidemiology 56, 1129-1135), se añadieron 0,5 unidades a cada valor y se recalculó el parámetro. Basándose en esta estimación, la OR de los pacientes con ganancia positiva de 16q22-24 de experimentar metástasis ósea fue de 62,63 (IC 95 % 3,42-1147,78), y la OR de la ganancia de CNA de 16q22-24 normalizada usando pacientes positivos para 14q32 frente al control fue de 225,89 (IC 95 % 11,22-4546,99). El pequeño tamaño de la cohorte hizo que las estimaciones fueran imprecisas pero dentro de una OR clínicamente relevante de al menos 3,42 y 11,22 en cada caso.

50 Basándose en los datos que usan FISH con el fin de medir las ganancias de 16q23, se extrajeron las características clínicas de diagnóstico. La ganancia de 16q22-24 (\geq 2,5 copias por célula) predice los pacientes con cáncer de pulmón en alto riesgo de metástasis ósea con una sensibilidad de 1,00, una especificidad de 0,772, un valor

predictivo positivo del 40,9 % y un valor predictivo negativo del 100,0 %.

Tabla 6: características clínicas de diagnóstico

		I.C.	95 %
Sensibilidad	100,0 %	70,1 %	-100,0 %
Especificidad	77,2 %	64,8 %	-86,2 %
VPP	40,9 %	23,3 %	-61,3 %
VPN	100,0 %	92,0 %	-100,0 %

5 Basándose en los datos que usan FISH con el fin de medir las ganancias de 16q23 normalizadas respecto a copias de 14q32, se extrajeron las características clínicas de diagnóstico. La ganancia de la CNA de 16q22-24 ($\geq 1,5$ copias de 16q23 por célula normalizadas a 14q32) predice el riesgo de metástasis ósea en el cáncer de pulmón con una sensibilidad de 1,00, una especificidad de 0,930, un valor predictivo positivo del 69,2 % y un valor predictivo negativo del 100,0 %.

10

Tabla 7:

características clínicas de diagnóstico		IC	95 %
Sensibilidad	100,0 %	70,1 %	-100,0 %
Especificidad	93,0 %	83,3 %	-97,2 %
VPP	69,2 %	42,4 %	-87,3 %
VPN	100,0 %	93,2 %	-100,0 %

15 La amplificación/ganancia de 16q22-24, y en particular el 16q23, o la ganancia de CNA en tumores de pulmón predice fuertemente y está asociada con el riesgo de metástasis ósea en cualquier momento.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Fundacio Privada Institut de Recerca Biomedica Fundacio Privada Institutio Catalana de Recerca I Estudis Avancats Gomis, Roger Planet, Evarist
- 25 <120> MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO DE METASTASIS DEL CÁNCER DE PULMÓN
- <130> 3190.002PC01/TJS/E-H
- <140> A asignar
- 30 <141> Con la presente
- <150> 61/656.372
- <151> 06-06-2012
- <160> 13
- 35 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 6878
- 40 < 212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 705 237 T3

agaggcttta	aaatcttttt	tcatcttcta	gctgtagctc	gggctgcttg	tcggttggc	60
ctccccctcc	cccctttgct	ctctgcctcg	tctttcccca	ggacttcgct	attttgcttt	120
tttaaaaaaa	ggcaagaaag	aactaaactc	ccccctccct	ctcctccagt	cgggctgcac	180
ctctgccttg	cactttgcac	agaggtagag	agcgcgcgag	ggagagagag	gaaagaaaaa	240
aaataataaa	gagagccaag	cagaagagga	ggcgagaagc	atgaagtgtt	aactcccccg	300
tgccaaggcc	cgcgccgccc	ggacagacgc	ccgccgcgcc	tccagccccg	agcggacgcc	360
gcgcgcgccc	tgctgcagc	ccgggcccgc	gagggcgagcc	cttccttatg	caaagcgcgc	420
agcggagcgg	cgagcggggg	acgccgcgca	ccgggcccggg	ctcctccagc	ttcgccgccg	480
cagccaccac	cgccgccacc	gcagctcgcg	gaggatcttc	ccgagcctga	agccgccggc	540
tggcgcgca	aggaggcgag	cgagcaagga	ggggccgggg	cgagcgaggg	agcacattgg	600
cgtgagcagg	ggggagggag	ggcgggcgcg	gggggcccggg	gcagggcggg	ggggtgtgtg	660
tgtgagcgcg	ctcggaggtt	tggggccagc	caccgcccgcg	caagctagaa	gcgccccagc	720
ccggcaagct	ggctcaccgg	ctggccaccc	agcacagccc	gctggcccct	ctcctgcagc	780
ccatctggcg	gagcggcggc	ggcggcggcg	gcggcggcag	gagaatggca	tcagaactgg	840
caatgagcaa	ctccgacctg	cccaccagtc	ccctggccat	ggaatatgtt	aatgacttcg	900
atctgatgaa	gtttgaagtg	aaaaaggaac	cggtggagac	cgaccgcatc	atcagccagt	960
gcggccgtct	catcgccggg	ggctcgctgt	cctccacccc	catgagcacg	ccgtgcagct	1020
cggtgcccc	ttccccagc	ttctcggcgc	ccagcccggg	ctcgggcagc	gagcagaagg	1080

ES 2 705 237 T3

cgcacctgga agactactac tggatgaccg gctacccgca gcagctgaac cccgaggcgc 1140
 tgggcttcag ccccgaggac gcggtcgagg cgctcatcag caacagccac cagctccagg 1200
 gcggcttcga tggctacgcg cgcggggcgc agcagctggc cgcggcggcc ggggccggtg 1260
 ccggcgcctc cttgggcggc agcggcgagg agatgggccc cgcggcggcc gtggtgtccg 1320
 ccgtgatcgc cgcggccgcc gcgcagagcg gcgcgggccc gcactaccac caccaccacc 1380
 accacgccgc cggccaccac caccaccga cggccggcgc gcccggcgcc gcgggcagcg 1440
 cggccgcctc ggccgggtggc gctggggggc cggcggcgcg tggcccggcc agcgtgggg 1500
 gcggcggcgg cggcggcgcc ggcggaggcg gcggggggcgc ggcggggggcg gggggcgccc 1560
 tgcacccgca ccacgccgcc ggcggcctgc acttcgacga ccgcttctcc gacgagcagc 1620
 tggtgaccat gtctgtgcbc gagctgaacc ggcagctgcg cgggggtcagc aaggaggagg 1680
 tgatccggct gaagcagaag aggcggaccc tgaaaaaccg cggctatgcc cagtcctgcc 1740
 gcttcaagag ggtgcagcag agacacgtcc tggagtcgga gaagaaccag ctgctgcagc 1800
 aagtcgacca cctcaagcag gagatctcca ggtggtgcbc cgagagggac gcgtacaagg 1860
 agaaatacga gaagttggtg agcagcggct tccgagaaaa cggctcgagc agcgacaacc 1920
 cgtcctctcc cgagtttttc atgtgagtct gacacgcgat tccagctagc caccctgata 1980
 agtgctccgc ggggggtccgg ctcggtgtg ggcttgctag ttctagagcc atgctcgcca 2040
 ccacctcacc acccccaccc ccaccgagtt tggccccctt ggccccctac acacacacaa 2100
 acccgcacgc acacaccaca cacacacaca cacacacaca cacacccac accctgctcg 2160
 agtttgtggt ggtggtggct gttttaaac ggggagggaa tgggtgtctg gctcatggat 2220
 tgccaatctg aaattctcca taacttgcta gcttgttttt tttttttttt tacaccccc 2280
 cgcgccaccc cgggacttgc acaatgttca atgatctcag cagagttctt catgtgaaac 2340
 gttgatcacc tttgaagcct gcatcattca catatTTTTT cttcttcttc cccttcagtt 2400
 catgaactgg tgttcatttt ctgtgtgtgt gtgtgtttta ttttgtttg atttttttt 2460
 ttaattttac ttttagagct tgctgtgttg cccacctttt ttccaacctc caccctcact 2520
 ccttctcaac ccattctctc cgagatgaaa gaaaaaaaaa agcaaagttt tttttcttc 2580
 tcctgagttc ttcattgtgag attgagcttg caaaggaaaa aaaaatgtga aatgttatag 2640
 acttcagcgc tgccgagttc catcggggtt tttttttagc attgttatgc taaaatagag 2700
 aaaaaaatcc tcatgaacct tccacaatca agcctgcac aaccttctgg gtgtgacttg 2760
 tgagttttgg ccttgtgatg ccaaatctga gaggtttagt tgccattaaa aaaactcatt 2820
 ctcatctcat gcattattat gcttgctact ttgtcttagc aacaatgaac tataactgtt 2880
 tcaaagactt tatggaaaag agacattata ttaataaaaa aaaaaagcct gcatgctgga 2940

ES 2 705 237 T3

catgtatggt ataattatth tttccttttt ttttcctttt ggcttgaaa tggacgttcg 3000
 aagacttata gcatggcatt catacttttg ttttattgcc tcatgacttt tttgagttta 3060
 gaacaaaaca gtgcaaccgt agagccttct toccatgaaa ttttgcatct gctccaaaac 3120
 tgctttgagt tactcagaac ttcaacctcc caatgactg aaggcattcc ttgtcaaaga 3180
 taccagaatg ggttacacat ttaacctggc aaacattgaa gaactcttaa tgttttcttt 3240
 ttaataagaa tgacgccccca ctttggggac taaaattgtg ctattgccga gaagcagtct 3300
 aaaatthatt ttttaaaaag agaaactgcc ccattattht tggtttgtht tathththt 3360
 ttataththt tggctththg tcattgtcaa atgtggaatg ctctgggtht ctagtatata 3420
 atttaattct agthththata atctgttagc ccagthtaaaa tgtatgctac agataaagga 3480
 atgttataga taaatthgaa agagthtagt ctgththtagct gtagaththt taaacgattg 3540
 atgcactaaa ttgththacta ttgtgatgth aaggggggta gagththgcaa ggggactgth 3600
 taaaaaaagt agcttataca gcatgtgctt gcaacttaaa tataagthgg gtatgtgtag 3660
 tctthtgctat accactgact gtattgaaaa ccaaagtatt aagaggggaa acgcccctgt 3720
 ttatatctgt aggggtatth tacattcaaa aatgtatgth tthththctt thcaaaaatta 3780
 aagthththg gactgaattg cactaagata taacctgcaa gcatataata caaaaaaaaa 3840
 ttgcaaaaact gththagaacg ctaataaaat thatgcagth ataaaaatgg cactactgca 3900
 cagththtaag atgatgcaga tthththaca gthgtatthg gthgcagaac tggaththct 3960
 gtaacttaaa aaaaaatcca cagththtaaa ggcaataatc agthaaatgth atththcaggg 4020
 actgacatcc tgtctthtaaa aagaaatgaa aagthaaatct taccacaata aatataaaaa 4080
 aatctthgca gthactththc ththacatat thtgctgthg aaaathgtht tatatctthg 4140
 gthactaact aaccacgctg gthgthctta tgtgctththc ththcatththc aathctgtht 4200
 atatcaagaa aagaataatc tacaataata aacggcatht thththgath ctgtactcag 4260
 ththcttagth tacagththaa ctgggcccac caacctctgth aaaaagthaa aatgcatcct 4320
 ththctccagth ggaaggathc ctggaggaat agggagacag taathcaggg thgaaattata 4380
 ggctgththth tgaagthgag aggctggccc catatactga thagcaatat thaatataga 4440
 thgaaattat gacctathth ththctcccc aaagthththc gthththcaat gagthgagcc 4500
 athaathgccc thgthtaggaa aaacaaaaca aaacagthgga actagthctc ctgagcathg 4560
 ccctacacth ctgatcagga gcaaaagccat ccatagacag aggagccgga caaatathggc 4620
 gcatcagagth tggctthgctg acatathgcat tgaacgthaa agagaacag ctgthgctth 4680
 thcactaaaag thgactathth thctthctthc ththacacac cgagaththc thgthtagcaa 4740
 ggcctgacaa gaththaacat aaacathgaca aathcatagth gththgththg ththgctthth 4800
 ctctthtaaca ctgaagathc ththgththaa ataggaaaa gaaaathccac thctthacth 4860

ES 2 705 237 T3

catatttcca agtacatatac tggtttaaac tatgttatca aatcatattt cacctggaat 4920
 attcagtgga gaacttctct acctggatga gctagtaatg atttcagatc atgctatccc 4980
 cagaaataaa agcaaaaaat aatacctgtg tggaatatag gctgtgcttt gatttactgg 5040
 tattttacccc aaaataggct gtgtatgggg gctgacttaa agatcccttg gaaagactca 5100
 aaactacctt cactagtagg actcctaagc gctgacctat ttttaaatac cacaattca 5160
 tgaaactaat gttacaaatt catgcagttt gcactcttag tcatcttccc ctagcacacc 5220
 aatagaatgt tagacaaagc cagcactggt ttgaaaatac agccaaacac gatgactttt 5280
 gttttgtttt ctgccgttct taaaagaaaa aaagataata ttgcaactct gactgaaaga 5340
 cttattttta agaaaacagg ttgtgtttgg tgctgctaag ttctggccag tttatcatct 5400
 ggcttctctg cctatttttt acaaaacacg aagacagtgt gtaacctcga cattttgacc 5460
 ttcctttatg tgctagttaa gacaggctcc tgaatccaca cttattttg cttacaaaa 5520
 gtcttaatag taaacctccc ctcatgagct tgaagtcaag tgttcttgac ttcagatatt 5580
 tctttccttt tttttttttt ttctcatca caactaagag atacacaaac tctgaagaag 5640
 cagaaatgga gagaatgctt ttaacaaaaa agcatctgat gaaagatttt aggcaaacat 5700
 tctcaaaaata agagtgatata tctggatgta gttattgacg ttatctcatg acaaatgagg 5760
 cctggattgg aaggaaaata tagttgtgta gaattaagca ttttgatagg aatctacaag 5820
 gtagttgaat ataataagca ggtttgggcc cccaaacttt agaaaatcaa atgcaaagg 5880
 gctggcaaaa atgaggtttg agtggctggc tgtaagagaa ggtaactcc tagtaaaagg 5940
 catttttaga aataacaatt actgaaaact ttgaagtata gtgggagtag caaacaata 6000
 catgtttttt ttttcttaca aagaactcct aatcctgag taagtgccat tcattacaat 6060
 aagtctctaa atttaaaaaa aaaaaaatca tatgaggaaa tctagctttc ccctttacgc 6120
 tgcgtttgat ctttgtctaa atagtgttaa aattcctttc attccaatta cagaactgag 6180
 cccactcgca agttggagcc atcagtggga tacgccacat tttggaagcc ccagcatcgt 6240
 gtacttacca gtgtgttcac aaaatgaaat ttgtgtgaga gctgtacatt aaaaaaatc 6300
 atcattatta ttattatttg cagtcatgga gaaccaccta cccctgactt ctgtttagtc 6360
 tcctttttaa ataaaaatta ctgtgttaga gaagaaggct attaaatgta gtagttaact 6420
 atgcctcttg tctgggggtt tcatagagac cggtaggaaa gcgcactcct gcttttcgat 6480
 ttatggtgtg tgcaagtaaa caggtgcatt gctttcaacc tgccatacta gttttaaaaa 6540
 ttactgaaa ttacaaagat acatatatat gcatatatat aatggaaagt ttcccggat 6600
 gcaacaatta gcatttttaa atcatatata ggcatgcaca ttctaaatag tactttttca 6660
 tgcttcattg tttctctggc agataatttt actaagaaga aaaatagata ttcgactccc 6720

ES 2 705 237 T3

cttccctaaa caaatccacg ggcagaggct ccagcggagc cgagccccct ggttttctcg 6780
 taggccttag acggtgttgc atttatcagt gatgtcaaac gtgctcattt gtcagacata 6840
 gctgtaaatg aaaacaatgt gtggcaaaat acaaagtt 6878

<210> 2
 <211> 2656
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

gaggctttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggcttggcc 60
 tccccctccc ccctttgctc tctgcctcgt ctttccccag gacttcgcta ttttgctttt 120
 ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcctccagtc gggctgcacc 180
 tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa 240
 aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt 300
 gccaaaggccc gcgccgcccg gacagacgcc cgcgcgcct ccagccccga gcggacgccg 360
 cgcgcgcctt gcctgcagcc cgggccggcg aggcgagccc tccttatgc aaagcgcga 420
 gcggagcggc gagcggggga cgcgcgcac cgggccgggc tcctccagct tcgccgccgc 480
 agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct 540
 cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggccggggc gagcgaggga gcacattggc 600
 gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg ggggtgtgtgt 660
 gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cgccccagcc 720
 cggcaagctg gctcaccgc tggccacca gcacagcccg ctggcccctc tcctgcagcc 780
 catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cggcggcagg agaatggcat cagaactggc 840
 aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttcga 900
 tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatca tcagccagtg 960
 cggccgtctc atcgccgggg gctcgtgtc ctccaccccc atgagcacgc cgtgcagctc 1020
 ggtgccccct tccccagct tctcggcgc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc 1080
 gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcgag cagctgaacc ccgaggcgt 1140
 gggcttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg 1200
 cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggccg gggccggtgc 1260
 cggcgcctcc ttgggcggca gcggcgagga gatgggccc gccgcggccg tgggtgtccgc 1320
 cgtgatcgcc gcggccgccg cgcagagcgg cgcgggccc cactaccacc accaccacca 1380
 ccacgccgcc ggccaccacc accacccgac ggccggcgcg cccggcgccg cgggcagcgc 1440
 gggcgcctcg gccggtggcg ctgggggcgc gggcggcggg ggcccggcca gcgctggggg 1500

10

ES 2 705 237 T3

cggcggcggc ggcggcggcg gcggagggcg cgggggcgcg gcgggggcgg ggggcgcctt 1560
gcacccgcac cacgccgccc gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct 1620
ggtgaccatg tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcmc ggggtcagca aggaggaggt 1680
gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc ggctatgccc agtcctgccc 1740
cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca 1800
agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcmc gagagggacg cgtacaagga 1860
gaaatacgag aagttggtga gcagcggcctt ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaaccc 1920
gtcctctccc gagtttttca taactgagcc cactcgcaag ttggagccat cagtgggata 1980
cgccacattt tggaagcccc agcatcgtgt acttaccagt gtgttcacaa aatgaaattt 2040
gtgtgagagc tgtacattaa aaaaaatcat cattattatt attatttgca gtcattggaga 2100
accacctacc cctgacttct gtttagtctc ctttttaaatt aaaaattact gtgttagaga 2160
agaaggctat taaatgtagt agttaactat gcctcttgtc tgggggtttc atagagaccg 2220
gtaggaaagc gcactcctgc ttttcgattt atggtgtgtg caagtaaaca ggtgcattgc 2280
tttcaacctg ccatactagt tttaaaaatt cactgaaatt acaaagatac atatatatgc 2340
atatatataa tggaaagttt cccggaatgc aacaattagc attttaaaat catatatagg 2400
catgcacatt ctaaatagta ctttttcatg cttcattggt tctctggcag ataattttac 2460
taagaagaaa aatagatatt cgactcccct tccctaaaca aatccacggg cagaggctcc 2520
agcggagccg agccccctgg ttttctcgta ggccttagac ggtgttgcat ttatcagtga 2580
tgtcaaactg gctcatttgt cagacatagc tgtaaatgaa aacaatgtgt ggcaaaaatac 2640
aaagttaaaa aaaaaa 2656

<210> 3
<211> 6887
< 212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

ES 2 705 237 T3

gaggctttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggcttggcc	60
tccccctccc ccctttgctc tctgcctcgt ctttccccag gacttcgcta ttttgctttt	120
ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcctccagtc gggctgcacc	180
tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa	240
aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccctg	300
gccaaggccc gcgccgcccg gacagacgcc cgccgcgcct ccagccccga gcggacgccg	360
cgcgcgccct gcctgcagcc cgggccggcg aggcgagccc ttccttatgc aaagcgcgca	420
gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggccgggc tcctccagct tcgccgccgc	480

ES 2 705 237 T3

agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct 540
 cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggccggggc gagcgaggga gcacattggc 600
 gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg ggggtgtgtgt 660
 gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cgccccagcc 720
 cggcaagctg gctcaccgcg tggccacca gcacagcccg ctggcccctc tcctgcagcc 780
 catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cggcggcagg agaatggcat cagaactggc 840
 aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttcga 900
 tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatca tcagccagtg 960
 cggccgtctc atcgccgggg gctcgtctgc ctccaccccc atgagcacgc cgtgcagctc 1020
 ggtgccccct tccccagct tctcggcgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc 1080
 gcacctgaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcgag cagctgaacc ccgagggcgt 1140
 gggcttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg 1200
 cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggccg gggccgggtg 1260
 cggcgcctcc ttgggcggca gcggcgagga gatgggcccc gccgccgccg tgggtgtccgc 1320
 cgtgatcgcc gcggccgccg cgcagagcgg cgcgggcccc cactaccacc accaccacca 1380
 ccacgccgcc ggccaccacc accaccgcac ggccggcgcg cccggcgccg cgggcagcgc 1440
 ggcgcctcg gccgggtggc ctgggggcgc gggcggcggt ggcccggcca gcgctggggg 1500
 cggcggcggc ggcggcggcg gcggaggcgg cgggggcgcg gcgggggcgg ggggcgcct 1560
 gcaccgcac cagccgccg gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct 1620
 ggtgaccatg tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt 1680
 gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc ggctatgcc agtcctgccg 1740
 cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca 1800
 agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcgc gagagggacg cgtacaagga 1860
 gaaatacgag aagtgtgtga gcagcggctt ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaacct 1920
 gtcctctccc gagtttttca tgtgagtctg acacgcgatt ccagctagcc accctgataa 1980
 gtgctccgcg ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgctagt tctagagcca tgctcgccac 2040
 cacctacca cccccacccc caccgagttt ggcccccttg gccccctaca cacacacaaa 2100
 cccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac acaccacaca ccctgctcga 2160
 gtttgtggtg gtggtggctg ttttaactg gggagggaat ggggtgtctgg ctcatggatt 2220
 gccaatctga aattctocat aacttgctag cttgtttttt tttttttttt acaccccccc 2280
 gccccacccc cggacttgca caatgttcaa tgatctcagc agagttcttc atgtgaaacg 2340
 ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atattttttc ttcttcttcc ccttcagttc 2400

ES 2 705 237 T3

atgaactggt gttcattttc tgtgtgtgtg tgtgttttat tttgtttgga tttttttttt 2460
taattttact ttttagagctt gctgtgtgtc ccaccttttt tccaacctcc accctcactc 2520
cttctcaacc catctcttcc gagatgaaag aaaaaaaaaa gcaaagtttt ttttcttct 2580
cctgagttct tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa aaaatgtgaa atgttataga 2640
cttgcagcgt gccgagttcc atcgggtttt ttttttagca ttgttatgct aaaatagaga 2700
aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gcctgcatca accttctggg tgtgacttgt 2760
gagttttggc cttgtgatgc caaatctgag agtttagtct gccattaaaa aaactcattc 2820
tcatctcatg cattattatg cttgctactt tgtcttagca acaatgaact ataactgttt 2880
caaagacttt atggaaaaga gacattatat taataaaaaa aaaaagcctg catgctggac 2940
atgtatggta taattatttt ttcctttttt tttccttttg gcttggaat ggacgttcga 3000
agacttatag catggcattc atacttttgt tttattgcct catgactttt ttgagtttag 3060
aacaaaacag tgcaaccgta ggccttctt cccatgaaat tttgcatctg ctccaaaact 3120
gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgcaactga aggcatcct tgtcaaagat 3180
accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag aactottaat gttttctttt 3240
taataagaat gacgccccac tttggggact aaaattgtgc tattgccgag aagcagtcta 3300
aaatttattt tttaaaaaga gaaactgccc cattattttt ggtttgttt atttttattt 3360
tatatttttt ggcttttggg cattgtcaaa tgtggaatgc tctgggtttc tagtatataa 3420
tttaattcta gtttttataa tctgttagcc cagttaaaat gtatgctaca gataaaggaa 3480
tgttatagat aaatttgaaa gagttagtc tgttttagctg tagatttttt aaacgattga 3540
tgcactaaat tgtttactat tgtgatgtta aggggggtag agtttgcaag gggactgttt 3600
aaaaaaagta gcttatacag catgtgcttg caacttaaat ataagttggg tatgtgtagt 3660
ctttgctata ccactgactg tattgaaaac caaagtatta agaggggaaa cgcccctgtt 3720
tatatctgta ggggtatttt acattcaaaa atgtatgttt ttttttcttt tcaaaattaa 3780
agtatttggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag catataatac aaaaaaaaaat 3840
tgcaaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagtta taaaaatggc attactgcac 3900
agttttaaga tgatgcagat ttttttacag ttgtattgtg gtgcagaact ggattttctg 3960
taacttaaaa aaaaatccac agttttaaag gcaataatca gtaaatgtta ttttcagga 4020
ctgacatcct gtcttttaaaa agaaatgaaa agtaaatcct accacaataa atataaaaaa 4080
atcttgtcag ttacttttct tttacatatt ttgctgtgca aaattgtttt atatcttgag 4140
ttactaacta accacgcgtg ttgttcctat gtgcttttct ttcattttca attctgggta 4200
tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatttt tttttgattc tgtactcagt 4260

ES 2 705 237 T3

ttcttagtgt	acagtttaac	tgggcccaac	aacctcgtta	aaagtgtaaa	atgcatcctt	4320
ttctccagtg	gaaggattcc	tggaggaata	gggagacagt	aattcagggg	gaaattatag	4380
gctgtttttt	gaagtgagga	ggctggcccc	atatactgat	tagcaatatt	taatatagat	4440
gtaaattatg	acctcatttt	tttctcccca	aagttttcag	ttttcaaatg	agttgagcca	4500
taattgccct	tggtagggaa	aacaaaacaa	aacagtggaa	ctaggcttcc	tgagcatggc	4560
cctacacttc	tgatcaggag	caaagccatc	catagacaga	ggagccggac	aaatatggcg	4620
catcagaggt	ggcttgcgca	catatgcatt	gaacggtaaa	gagaaacagc	gcttgccttt	4680
tcactaaagt	tgactatttt	tccttcttct	cttacacacc	gagattttct	tgttagcaag	4740
gcctgacaag	atthaacata	aacatgacaa	atcatagttg	tttgttttgt	tttgcttttc	4800
tctttaacac	tgaagatcat	ttgtcttaaa	taggaaaaag	aaaatccact	ccttacttcc	4860
atatttccaa	gtacatatct	ggtttaaaact	atggtatcaa	atcatatttc	accgtgaata	4920
ttcagtgagg	aacttctcta	cctggatgag	ctagtaatga	tttcagatca	tgctatcccc	4980
agaaataaaa	gcaaaaaata	atacctgtgt	ggaatatagg	ctgtgctttg	atttactggg	5040
atttacccca	aaataggctg	tgtatggggg	ctgacttaaa	gatcccttgg	aaagactcaa	5100
aactaccttc	actagtagga	ctcctaagcg	ctgacctatt	tttaaatgac	acaaattcat	5160
gaaactaatg	ttacaaattc	atgcagtttg	cactcttagt	catcttcccc	tagcacacca	5220
atagaatggt	agacaaagcc	agcactgttt	tgaaaataca	gccaaacacg	atgacttttg	5280
ttttgttttc	tgccgttctt	aaaagaaaaa	aagataatat	tgcaactctg	actgaaagac	5340
ttatttttta	gaaaacaggt	tgtgtttggg	gctgctaagt	tctggccagt	ttatcatctg	5400
gccttctctc	ctatttttta	caaaacacga	agacagtgtg	taacctcgac	attttgacct	5460
tcctttatgt	gctagtttag	acaggctcct	gaatccacac	ttaattttgc	ttaacaaaag	5520
tcttaatagt	aaacctcccc	tcattgagctt	gaagtcaagt	gttcttgact	tcagatattt	5580
ctttcctttt	tttttttttt	tcctcatcac	aactaagaga	tacacaaact	ctgaagaagc	5640
agaaatggag	agaatgcttt	taacaaaaaa	gcatctgatg	aaagatttta	ggcaaacatt	5700
ctcaaaataa	gagtgatatt	ctggatgtag	ttattgcagt	tatctcatga	caaatgaggc	5760
ctggattgga	aggaaaatat	agttgtgtag	aattaagcat	tttgatagga	atctacaagg	5820
tagttgaata	taataagcag	gtttggggcc	ccaaacttta	gaaaatcaaa	tgcaaagggtg	5880
ctggcaaaaa	tgaggtttga	gtggctggct	gtaagagaag	gttaactcct	agtaaaaggc	5940
attttttagaa	ataacaatta	ctgaaaactt	tgaagtatag	tgggagtagc	aaacaaatac	6000
atgttttttt	tttcttacia	agaactccta	aatcctgagt	aagtgccatt	cattacaata	6060
agtctctaaa	tttaaaaaaa	aaaaaatcat	atgaggaaat	ctagctttcc	cctttacgct	6120
gcgtttgatc	tttgtctaaa	tagtgttaaa	attcctttca	ttccaattac	agaactgagc	6180

ES 2 705 237 T3

ccactcgcaa gttggagcca tcagtgggat acgccacatt ttggaagccc cagcatcgtg 6240
 tacttaccag tgtgttcaca aaatgaaatt tgtgtgagag ctgtacatta aaaaaaatca 6300
 tcattattat tattatttgc agtcatggag aaccacctac cctgacttc tgtttagtct 6360
 cctttttaa taaaaattac tgtgttagag aagaaggcta ttaaagttag tagttaacta 6420
 tgcctcttgt ctggggggtt catagagacc ggtaggaaag cgcactcctg cttttcgatt 6480
 tatgggtgtg gcaagtaaac aggtgcattg ctttcaacct gccatactag ttttaaaaat 6540
 tcactgaaat tacaagata catatatatg catatatata atggaaagtt tcccggaatg 6600
 caacaattag cattttaaaa tcatatatag gcatgcacat tctaaatagt actttttcat 6660
 gcttcattgt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa aaatagatat tcgactcccc 6720
 ttccctaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc gagccccctg gttttctcgt 6780
 aggcctaga cgggtgtgca tttatcagtg atgtcaaacg tgctcatttg tcagacatag 6840
 ctgtaaata aaacaatgtg tggcaaaata caaagttaa aaaaaaa 6887

<210> 4
 <211> 403
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

Met Ala Ser Glu Leu Ala Met Ser Asn Ser Asp Leu Pro Thr Ser Pro
 1 5 10 15
 Leu Ala Met Glu Tyr Val Asn Asp Phe Asp Leu Met Lys Phe Glu Val
 20 25 30
 Lys Lys Glu Pro Val Glu Thr Asp Arg Ile Ile Ser Gln Cys Gly Arg
 35 40 45
 Leu Ile Ala Gly Gly Ser Leu Ser Ser Thr Pro Met Ser Thr Pro Cys
 50 55 60
 Ser Ser Val Pro Pro Ser Pro Ser Phe Ser Ala Pro Ser Pro Gly Ser
 65 70 75 80
 Gly Ser Glu Gln Lys Ala His Leu Glu Asp Tyr Tyr Trp Met Thr Gly
 85 90 95
 Tyr Pro Gln Gln Leu Asn Pro Glu Ala Leu Gly Phe Ser Pro Glu Asp
 100 105 110
 Ala Val Glu Ala Leu Ile Ser Asn Ser His Gln Leu Gln Gly Gly Phe
 115 120 125

10

ES 2 705 237 T3

Asp Gly Tyr Ala Arg Gly Ala Gln Gln Leu Ala Ala Ala Ala Gly Ala
 130 135 140

Gly Ala Gly Ala Ser Leu Gly Gly Ser Gly Glu Glu Met Gly Pro Ala
 145 150 155 160

Ala Ala Val Val Ser Ala Val Ile Ala Ala Ala Ala Ala Gln Ser Gly
 165 170 175

Ala Gly Pro His Tyr His His His His His His Ala Ala Gly His His
 180 185 190

His His Pro Thr Ala Gly Ala Pro Gly Ala Ala Gly Ser Ala Ala Ala
 195 200 205

Ser Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Pro Ala Ser Ala
 210 215 220

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala
 225 230 235 240

Gly Ala Gly Gly Ala Leu His Pro His His Ala Ala Gly Gly Leu His
 245 250 255

Phe Asp Asp Arg Phe Ser Asp Glu Gln Leu Val Thr Met Ser Val Arg
 260 265 270

Glu Leu Asn Arg Gln Leu Arg Gly Val Ser Lys Glu Glu Val Ile Arg
 275 280 285

Leu Lys Gln Lys Arg Arg Thr Leu Lys Asn Arg Gly Tyr Ala Gln Ser
 290 295 300

Cys Arg Phe Lys Arg Val Gln Gln Arg His Val Leu Glu Ser Glu Lys
 305 310 315 320

Asn Gln Leu Leu Gln Gln Val Asp His Leu Lys Gln Glu Ile Ser Arg
 325 330 335

Leu Val Arg Glu Arg Asp Ala Tyr Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Leu Val
 340 345 350

Ser Ser Gly Phe Arg Glu Asn Gly Ser Ser Ser Asp Asn Pro Ser Ser
 355 360 365

Pro Glu Phe Phe Ile Thr Glu Pro Thr Arg Lys Leu Glu Pro Ser Val

ES 2 705 237 T3

370

375

380

Gly Tyr Ala Thr Phe Trp Lys Pro Gln His Arg Val Leu Thr Ser Val
 385 390 395 400

Phe Thr Lys

<210> 5
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

Met Ala Ser Glu Leu Ala Met Ser Asn Ser Asp Leu Pro Thr Ser Pro
 1 5 10 15

Leu Ala Met Glu Tyr Val Asn Asp Phe Asp Leu Met Lys Phe Glu Val
 20 25 30

Lys Lys Glu Pro Val Glu Thr Asp Arg Ile Ile Ser Gln Cys Gly Arg
 35 40 45

Leu Ile Ala Gly Gly Ser Leu Ser Ser Thr Pro Met Ser Thr Pro Cys
 50 55 60

Ser Ser Val Pro Pro Ser Pro Ser Phe Ser Ala Pro Ser Pro Gly Ser
 65 70 75 80

Gly Ser Glu Gln Lys Ala His Leu Glu Asp Tyr Tyr Trp Met Thr Gly
 85 90 95

Tyr Pro Gln Gln Leu Asn Pro Glu Ala Leu Gly Phe Ser Pro Glu Asp
 100 105 110

Ala Val Glu Ala Leu Ile Ser Asn Ser His Gln Leu Gln Gly Gly Phe
 115 120 125

Asp Gly Tyr Ala Arg Gly Ala Gln Gln Leu Ala Ala Ala Gly Ala
 130 135 140

Gly Ala Gly Ala Ser Leu Gly Gly Ser Gly Glu Glu Met Gly Pro Ala
 145 150 155 160

Ala Ala Val Val Ser Ala Val Ile Ala Ala Ala Ala Ala Gln Ser Gly
 165 170 175

Ala Gly Pro His Tyr His His His His His His Ala Ala Gly His His

10

ES 2 705 237 T3

			180					185					190			
	His	His	Pro	Thr	Ala	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Ala	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala
			195					200					205			
	Ser	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Ala	Ser	Ala
	210							215					220			
	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala
	225							230					235			240
	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Leu	His	Pro	His	His	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	His
					245						250				255	
	Phe	Asp	Asp	Arg	Phe	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Val	Thr	Met	Ser	Val	Arg
				260										270		
	Glu	Leu	Asn	Arg	Gln	Leu	Arg	Gly	Val	Ser	Lys	Glu	Glu	Val	Ile	Arg
			275					280						285		
	Leu	Lys	Gln	Lys	Arg	Arg	Thr	Leu	Lys	Asn	Arg	Gly	Tyr	Ala	Gln	Ser
		290					295					300				
	Cys	Arg	Phe	Lys	Arg	Val	Gln	Gln	Arg	His	Val	Leu	Glu	Ser	Glu	Lys
	305					310					315					320
	Asn	Gln	Leu	Leu	Gln	Gln	Val	Asp	His	Leu	Lys	Gln	Glu	Ile	Ser	Arg
					325						330				335	
	Leu	Val	Arg	Glu	Arg	Asp	Ala	Tyr	Lys	Glu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Leu	Val
				340					345					350		
	Ser	Ser	Gly	Phe	Arg	Glu	Asn	Gly	Ser	Ser	Ser	Asp	Asn	Pro	Ser	Ser
			355					360					365			
	Pro	Glu	Phe	Phe	Met											
		370														

<210> 6
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> ARNip especifico de c-MAF

10

<400> 6
 acggcucgag cagcgacaa 19

15

<210> 7
 <211> 19

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> ARNip específico de c-MAF

 <400> 7
 cuuaccagug uguucacaa 19

 10 <210> 8
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> ARNip específico de c-MAF

 <400> 8
 20 uggaagacua cuacuggaug 20

 <210> 9
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> ARNip específico de c-MAF

 <400> 9
 30 auuugcaguc auggagaacc 20

 <210> 10
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> ARNip específico de c-MAF

 <400> 10
 40 caaggagaaa uacgagaagu 20

 <210> 11
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> ARNip específico de c-MAF
 50
 <400> 11
 acaaggagaa auacgagaag 20

 <210> 12
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> ARNip específico de c-MAF
 60
 <400> 12
 accuggaaga cuacuacugg 20

 <210> 13
 <211> 13878
 65

ES 2 705 237 T3

< 212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

5

aactatatat	taaacacctc	cggtctgaga	ggccgtggtg	ggtgtctttg	tcaggtgaag	60
aaagagaaga	aggctggtac	accttcccag	gaattctcac	tgaagaaac	atctggattt	120
tttacatctc	ttgtgcaaaa	caaacaaaga	tttcattaag	tgatgtatat	tgttttccaa	180
ggaagaaacc	tgagagaca	aaaacaaata	agcaaataat	tgaacaaaa	atatgataaa	240
cccccaaatt	cttccagtgc	taatttactt	gttatcatgg	ttctctacaa	aggcagagat	300
cactaattac	aggtttttcc	agaattcaca	tttcacgtca	agatcatcca	atccaaacag	360
tgtacggaaa	gcctagggcc	ttcttcaactt	tgccccctac	cccaccctac	acacacgccc	420
ccatctaaat	gatacccttg	gaaagaaacc	tacacatctc	atgtgtctat	attttgcttc	480
ctccctcgcc	tcccggtaac	caaatgtgag	ttgttctcta	actgcactgg	agaatcagaa	540
tttattgtac	atatgtttgt	gttccactta	ataaaaaaac	ctatatttta	agataaactt	600
tgtagtaaat	tcagaggta	agtgactatt	tatgctaadc	aggcagaaat	atattctcaa	660
gcataatgca	ttacataaat	ttgaatgtaa	aatgttcaat	tatgaagtaa	atacaggtaa	720
tgcaataaat	aaattacctc	taataaaaaat	tataaaagat	gtgccttgaa	agagagagcg	780
gctttaactt	acaactgtga	attgcttaaa	gagaaaagaa	ttaataaatg	ctgaattact	840
ctgatgatta	tttagcacat	aattcaccta	ttcataacga	ctcctagtaa	tcagactgtt	900
gtttcacatc	ctccaacatg	aggcaagact	gtttcctcag	caattttgcc	cttatcagat	960
tatctcgtct	gattctatta	attttcttcc	atgaatctgc	taacagtgat	ttgtgattta	1020
cttaccctgc	taactgaaga	ctgttaaaag	gatttatcta	acactggacc	taagaacagt	1080
gtacgcctta	tcgttcagtt	actctgaaga	actctttctc	aatcaattt	agttggtttc	1140
atagtgaat	ttagtggaaca	ctggtagtt	ctgcccata	aatcagccc	ctaaacaaag	1200
agtccagaca	ccatacctga	tgcatcccat	tctattcaga	ttatggatgt	ctgattccaa	1260
catgatatat	ttgagttgct	ataactcaca	atcggggaaa	atatattcct	ttaagctttt	1320
aatctttgta	atgtggacat	gaacaggggt	tttgtttttc	atttttgcat	gaagtcatta	1380
tgtatgtact	gacgtgaaac	tataattgtg	tttctgatgt	tactgtgtca	caatattcta	1440

ES 2 705 237 T3

tgcgatgtaa	cccatgtcct	cctccccctc	acaaatctcc	tataaatatt	cattgctttc	1500
aaaaacttta	atactactgg	tccgaattgg	tcaataatga	caaatgcatg	gtttctaaat	1560
tactgtatat	tgttctacag	agattactag	agtatatata	gcaaggggat	gttaagcagt	1620
aagaaaacac	agttcacatt	gtatttggat	tagattggct	tggatagaag	tgaaacaaac	1680
aatgtagca	aagaagtcta	aagacatgtg	gcccactgta	attgtacaga	atcaaaaacc	1740
tgaatagtac	tcattaaaat	gagagagctc	aattgttata	aaagaaatgc	tgctaacaga	1800
gaactgtaaa	tgtttagaca	cccctgtgaa	tcactaaata	ataatgtaa	aaggataaaa	1860
atgagaatta	agttataagc	ctgagagcat	tactgctaca	catctaaaa	aataattctg	1920
atcctctctt	tttttttcc	aagagaaaat	gggcgactat	aaaagacctt	gcaataagag	1980
aaataaaaaat	accatgtctt	cacagcagtg	tacataaata	aaccataaaa	atgtgcagat	2040
aataatatat	ttagctgccc	aaacatggc	atttaatttc	tagaaatgat	atataacaat	2100
gtaacaatta	gatactcagc	catgaatgtg	tatggcacag	tcttcatcat	tagcaaactt	2160
tgtgtataaa	atattattta	ttatttatta	taactactgt	ttcagaggca	atgatcatac	2220
cttacagctt	ttaacacaaa	tatgatgcaa	aaggattaaa	agtatatcat	aaacaaacia	2280
taaattcttt	ctaaatacac	ttaaattcat	atcttcatg	aaaaatata	acttctaca	2340
tttgtgacta	ctgactttta	aaaagaccta	gaaaactatt	gttacgggca	atgttaaattg	2400
acataatgct	tatgtaattg	aaagtgtgga	ttttcctcta	aataaactat	aatcccttaa	2460
cttcattact	agggaaaata	ttgttaaaga	gaaggaaagc	aaggaattc	tgctagggtg	2520
cataaatatt	gacataatct	tcactctttc	ttccccaaac	tggtaataga	catagtttat	2580
tccacccaac	aaaatgctct	tataagacca	aaactaccct	tattaacaac	ttctctgcag	2640
tcacgatgaa	aagaaacact	acttgtctga	aaaataccga	cagcgctgcc	cttttcagat	2700
taggggtgtc	ctacgaatct	tttgggaagt	cttcattaa	ggattcctgg	gtttgtctgaa	2760
actgaagtct	actaggatca	gagaaattaa	cacaggtcta	atatggtgca	aggaacgagt	2820
gagagacacc	tgaggttata	aatagcaaag	catgctgcgg	ggtggggaag	accattctga	2880
agtgcaatgt	tcaagacgct	ggcttaatat	atgactaagt	gtcagaagtc	aggttttctg	2940
agaattactt	tccagataaa	caactttata	gcactgcact	taatcttact	tactagagac	3000
atctcattta	tcactgaatt	acaagtaact	ttaatcctat	tgatattgcc	ataaagcccg	3060
ttgaaaatcc	atcctggcac	ttttaaaggg	tttggggccc	tgttacatgg	ggatcctctt	3120
gcaaaggtct	cagccagaaa	ttacaccccg	agggtgtctg	tatcccctgg	cctctttgtc	3180
aacaatcaag	gagaagagga	ggggcaaaaa	tgatctctgc	atctgccagc	actttcttcg	3240
gcccctttcc	tatagggtcg	ggttctccca	cttcagtcaa	actaactttg	tgtgtctctt	3300
tcctcctccc	acactgggta	accagctgct	tttcacttca	tcgacaaaac	tggacacgga	3360

ES 2 705 237 T3

tcaatttcaa ctgacctttg ccgaaaggtg gcgctgttga ggtaaaaacc aactcgctcc 3420
aacaatagtt tccactcttc gatccttttg caggcttttc agaatttttt ttttttttta 3480
atgcaccctc cttagcgtctc ccccttctca taaagtaaaa taaatacgat taaaaacacc 3540
aatgcattt cattaattga aggaatcaac agtcccaact tctaagcaga cgggctggtc 3600
ttccaaaggc tgggtcgggt tcaggagctt tctctccaaa taaatctctg cttcttcgac 3660
ttgcctatcg ctttaaaatc ttagaaacag agttagttgt tggtttcctt cttttttctt 3720
tttctttttt atttcttttt tgcataaact tttagagaat caatctagaa atttgaacta 3780
cttattagca tttgcaactg ggggtggggg gagcagcctc cccacccca cccccactc 3840
tgcgtttccg gactagtcc agaaccgcg gtttaaaatt taacccttcg agggtagctg 3900
gtgagggctg gggattgtt tttcccctt gctccctgcc acgatcaagt ccgaaataat 3960
taaaggaaac gtaaaagtgc aaagggcgcg cctgaccctg ataaacagag gtcagatttc 4020
gtaaggggac ggggtgagtgt gagtgtgtgt gtgtttgtgt gtgtgtgtgt aagagagaga 4080
gagagcgagc gcgcaatatg agtctcaaag gccaaactcc ggccagtcag gagccggaag 4140
gctgagcccg gctgacctga ctttgagctt ccccgagtt atctcgcata ggcgctcgct 4200
ctgtccaagg gcacgcgacg ccagcgggca gccggtctcc gtgaagaatg gcctctaaac 4260
aacttatttt acctcgttgt aaagagaggg ataaaatggg ctttccctct ccacggatgc 4320
ccagccttct gggcaggcgc atggccgggc ggcgcccagc ccgcagcccc gatccggaca 4380
ccccactgca tccctccctt cccggtccct tccccgcacg ggcgcccag agacggacaa 4440
agagttgggg ccaagtttga gcgccgggca cggccaggct caggggaagga aggtccccgg 4500
cagacacctg ggtaccagag ttggtgcgag gaggaaaagc tgggaggcga attcacaatc 4560
ctgggggtgg agggcaggca ggggagggga atcaggccaa tcccagccga gtgagcccc 4620
agcgagctgg ggctccgat gggaggcctg tctcgcgctc caaagaaaag caaacgccc 4680
tcccaggtcc gcccgattg ccgaagcccc tctggaaaaa ctcttcccc tcttacacca 4740
aactttgcgc cgggcctcgt tccctcccgg gtaggcagcg gcgcaggaag ggtaagcca 4800
gcccgtccca gctgacagtc agctgattgg gccctgattg acagctccga aaagtttctt 4860
tgtttctata ctattatgct aatcgcggcc gctctcgccg cctcccattg gcccgagtg 4920
ccagtcaatt tctcatttg acctgacgtc acgagtgcta taaaactcag caattgcttt 4980
aaactcttct tgctggatca gaggtttta aatctttttt catcttctag ctgtagctcg 5040
ggctgcttgt cggttggcc tccccctccc ccttttgcctc tctgcctcgt ctttccccag 5100
gacttcgcta ttttgctttt ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc 5160
tcctccagtc gggctgcacc tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg 5220

ES 2 705 237 T3

gagagagagg aaagaaaaa aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca 5280
tgaagtgtta actccccgt gccaaaggccc gcgccgcccg gacagacgcc cgccgcgcct 5340
ccagccccga gcggacgccg cgcgcgccct gcctgcagcc cgggcccggcg aggcgagccc 5400
ttccttatgc aaagcgcgca gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggcccggc 5460
tcctccagct tcgcccgcgc agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc 5520
cgagcctgaa gccgcccggct cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggcccggggc 5580
gagcgaggga gcacattggc gtgagcaggg gggagggagg gcgggcccggc gggcgcgggg 5640
cagggcgggg ggggtgtgtgt gtgagcgcgc tcggaggttt cgggcccagcc accgccgcgc 5700
aagctagaag cgccccagcc cggcaagctg gctcaccgcc tggccacca gcacagcccg 5760
ctggcccctc tcctgcagcc catctggcgg agcggcggcg gcggcggcg cggcggcagg 5820
agaatggcat cagaactggc aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg 5880
gaatatgtta atgacttcga tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc 5940
gaccgcatca tcagccagtg cggccgtctc atcgccgggg gctcgcctgc ctccaccccc 6000
atgagcacgc cgtgcagctc ggtgccccct tccccagct tctcggcgcc cagcccgggc 6060
tcgggcagcg agcagaaggc gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcag 6120
cagctgaacc ccgaggcgct gggcttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc 6180
aacagccacc agctccaggg cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc 6240
gcggcggccg gggccgggtgc cggcgcctcc ttgggcggca gcggcgagga gatgggcccc 6300
gccgccgccg tgggtgtccgc cgtgatcgcc gcggccgccg cgagagcgg cgccggccccg 6360
cactaccacc accaccacca ccacgcgccg gccaccacc accaccgcac ggccggcgcg 6420
cccggcgccg cgggcagcgc ggccgcctcg gccggtggcg ctggggggcgc gggcggcggt 6480
ggccccggca gcgctggggg cggcggcggc ggcggcggcg gcggaggcgg cgggggcgcg 6540
gcggggggcg ggggcgcctt gcacccgcac cacgcgcgcg gcggcctgca cttcgacgac 6600
cgcttctccg acgagcagct ggtgacctg tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcgc 6660
ggggtcagca aggaggaggt gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc 6720
ggctatgcc agtcctgccg cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtccgag 6780
aagaaccagc tgctgcagca agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcgc 6840
gagagggacg cgtacaagga gaaatacgag aagttggtga gcagcggctt ccgagaaaaac 6900
ggctcgagca gcgacaacc gtccctctcc gagtttttca tgtgagtctg acacgcgatt 6960
ccagctagcc accctgataa gtgctccgcg ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgctagt 7020
tctagagcca tgctcgccac cacctacca ccccccccc caccgagttt ggcccccttg 7080
gccccctaca cacacacaaa cccgcagcga cacaccacac acacacacac acacacacac 7140

ES 2 705 237 T3

acaccccaca	ccctgctcga	gtttgtggtg	gtggtggctg	ttttaaactg	gggagggaaat	7200
gggtgtctgg	ctcatggatt	gccaatctga	aattctccat	aacttgctag	cttgtttttt	7260
tttttttttt	acaccccccc	gccccacccc	cggaactgca	caatgttcaa	tgatctcagc	7320
agagttcttc	atgtgaaacg	ttgatcacct	ttgaagcctg	catcattcac	atattttttc	7380
ttcttcttcc	ccttcagttc	atgaactggg	gttcattttc	tgtgtgtgtg	tgtgttttat	7440
tttgtttgga	tttttttttt	taattttact	tttagagctt	gctgtggtgc	ccaccttttt	7500
tccaacctcc	accctcactc	cttctcaacc	catctcttcc	gagatgaaag	aaaaaaaaaa	7560
gcaaagtttt	tttttcttct	cctgagttct	tcatgtgaga	ttgagcttgc	aaaggaaaaa	7620
aaaatgtgaa	atgttataga	cttgcagcgt	gccgagttcc	atcgggtttt	ttttttagca	7680
ttgttatgct	aaaatagaga	aaaaaatcct	catgaacctt	ccacaatcaa	gcctgcatca	7740
accttctggg	tgtgacttgt	gagttttggc	cttgtgatgc	caaatctgag	agtttagtct	7800
gccattaaaa	aaactcattc	tcatctcatg	cattattatg	cttgctactt	tgtcttagca	7860
acaatgaact	ataactgttt	caaagacttt	atggaaaaga	gacattatat	taataaaaaa	7920
aaaaagcctg	catgctggac	atgtatggta	taattatttt	ttcctttttt	tttccttttg	7980
gcttggaat	ggacgttcga	agacttatag	catggcattc	atacttttgt	tttattgcct	8040
catgactttt	ttgagtttag	aacaaaacag	tgcaaccgta	gagccttctt	cccatgaaat	8100
tttgcacctg	ctccaaaact	gctttgagtt	actcagaact	tcaacctccc	aatgcaactga	8160
aggcattcct	tgtcaaagat	accagaatgg	gttacacatt	taacctggca	aacattgaaag	8220
aaactttaat	gttttctttt	taataagaat	gacgccccac	tttggggact	aaaattgtgc	8280
tattgccgag	aagcagtcta	aaatttattt	tttaaaaaga	gaaactgccc	cattattttt	8340
ggtttgtttt	atttttattt	tatatTTTTT	ggcttttggg	cattgtcaaa	tgtggaatgc	8400
tctgggtttc	tagtatataa	tttaattcta	gtttttataa	tctgttagcc	cagttaaaaat	8460
gtatgctaca	gataaaggaa	tgttatagat	aaatttgaaa	gagttaggtc	tgtttagctg	8520
tagatttttt	aaacgattga	tgcactaaat	tgtttactat	tgtgatgtta	aggggggtag	8580
agtttgcaag	gggactgttt	aaaaaaagta	gcttatacag	catgtgcttg	caacttaaat	8640
ataagttggg	tatgtgtagt	ctttgctata	ccactgactg	tattgaaaac	caaagtatta	8700
agaggggaaa	cgcccctggt	tatatctgta	ggggtatttt	acattcaaaa	atgtatgttt	8760
ttttttcttt	tcaaaaattaa	agtatttggg	actgaattgc	actaagatat	aacctgcaag	8820
catataatac	aaaaaaaaaat	tgcaaaaactg	tttagaacgc	taataaaaatt	tatgcagtta	8880
taaaaatggc	attactgcac	agttttaaga	tgatgcagat	ttttttacag	ttgtattgtg	8940
gtgcagaact	ggattttctg	taacttaaaa	aaaaatccac	agttttaaag	gcaataatca	9000

ES 2 705 237 T3

gtaaatgtta ttttcagggga ctgacatcct gtcttttaaaa agaaatgaaa agtaaatcct 9060
 accacaataa atataaaaaa atcttgtcag ttacttttct tttacatatt ttgctgtgca 9120
 aaattgtttt atatcttgag ttactaacta accacgcgtg ttgttcctat gtgcttttct 9180
 ttcattttca atttctggta tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatttt 9240
 tttttgattc tgtactcagt ttcttagtgt acagtttaac tgggcccaac aacctcgta 9300
 aaagtgtaaa atgcatcctt ttctccagtg gaaggattcc tggaggaata gggagacagt 9360
 aattcagggg gaaattatag gctgtttttt gaagtgagga ggctggcccc atatactgat 9420
 tagcaatatt taatatagat gtaaattatg acctcatttt tttctcccca aagttttcag 9480
 ttttcaaag agttgagcca taattgccct tggtaggaaa aacaaaacaa aacagtggaa 9540
 ctaggcttcc tgagcatggc cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga 9600
 ggagccggac aaatatggcg catcagaggt ggcttgcgca catatgcatt gaacggtaaa 9660
 gagaaacagc gcttgccttt tcaactaaagt tgactatfff tcttcttct cttacacacc 9720
 gagatfffct tgttagcaag gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagttg 9780
 tttgttttgt tttgcttttc tctttaacac tgaagatcat ttgtcttaa taggaaaaag 9840
 aaaatccact cttacttcc atatttcaa gtacatatct ggtttaaact atgttatcaa 9900
 atcatatffc accgtgaata ttcagtggag aacttctcta cctggatgag ctagtaatga 9960
 tttcagatca tgctatcccc agaaataaaa gcaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg 10020
 ctgtgctttg atttactggg atttacccca aaataggctg tgtatggggg ctgacttaa 10080
 gatcccttgg aaagactcaa aactaccttc actagtagga ctccctaagcg ctgacctatt 10140
 tttaaatgac acaaattcat gaaactaatg ttacaaattc atgcagttt cactcttagt 10200
 catcttcccc tagcacacca atagaatgtt agacaaagcc agcactgttt tgaataata 10260
 gccaaacacg atgacttttg tttgttttc tgccgttctt aaaagaaaaa aagataatat 10320
 tgcaactctg actgaaagac ttatftttta gaaaacaggt tgtgtttggg gctgctaagt 10380
 tctggccagt ttatcatctg gccttcctgc ctatftttta caaaacacga agacagtgtg 10440
 taacctcgac atfttgacct tctttatgt gctagtttag acaggctcct gaatccacac 10500
 ttaatfttgc ttaacaaaag tcttaatagt aaacctcccc tcatgagctt gaagtcaagt 10560
 gttcttgact tcagatattt ctttctttt tftftftftt tctcatcac aactaagaga 10620
 tacacaaact ctgaagaagc agaaatggag agaatgcttt taacaaaaaa gcatctgatg 10680
 aaagatftta ggcaaacatt ctcaaaataa gagtgatatt ctggatgtag ttattgcagt 10740
 tatctcatga caaatgaggc ctggattgga aggaaaatat agttgtgtag aattaagcat 10800
 tttgatagga atctacaagg tagttgaata taataagcag gtttgggcc ccaactfta 10860
 gaaaatcaa tgcaaaggtg ctggcaaaaa tgaggtttga gtggctggct gtaagagaag 10920

ES 2 705 237 T3

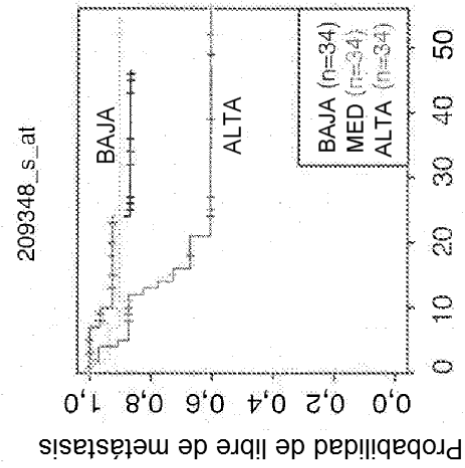
gttaactcct agtaaaaggc attttttagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag 10980
 tgggagtagc aaacaaatac atgttttttt tttcttacia agaactccta aatcctgagt 11040
 aagtgccatt cattacaata agtctctaaa tttaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat 11100
 ctagctttcc cctttacgct gcgtttgatc tttgtctaaa tagtgtaaa attcctttca 11160
 ttccaattac agaactgagc ccaactcgaa gttggagcca tcagtgggat acgccacatt 11220
 ttggaagccc cagcatcgtg tacttaccag tgtgttcaca aatgaaatt tgtgtgagag 11280
 ctgtacatta aaaaaaatca tcattattat tattatttgc agtcatggag aaccacctac 11340
 ccctgacttc tgtttagtct cctttttaa taaaaattac tgtgttagag aagaaggcta 11400
 ttaaatgtag tagttaacta tgcctcttgt ctggggggtt catagagacc ggtaggaaag 11460
 cgcactcctg cttttcgatt tatgggtgtg gcaagtaaac aggtgcattg ctttcaacct 11520
 gccatactag ttttaaaaat tcaactgaaat taciaagata catatatatg catatatata 11580
 atggaaagtt tcccggaatg caacaattag cattttaaaa tcatatatag gcatgcacat 11640
 tctaaatagt actttttcat gcttcattgt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa 11700
 aaatagatat tcgactcccc ttccctaacc aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc 11760
 gagccccctg gttttctcgt aggccctaga cgggtgttga tttatcagtg atgtcaaacg 11820
 tgctcatttg tcagacatag ctgtaaatga aaacaatgtg tggcaaaata caaagttagt 11880
 taaatacaca ccctctgtgt gatTTTTTgc tcccttttct tttttgctcc tactcaaaaa 11940
 aaaaaaatc acctccttta catttcctg gcttcttga tgtttccctt ttcaaaaacc 12000
 atgtaataat tttttacaat gtatctgaca cattaatata ttgacatcaa ataggcagac 12060
 attctacttt tgcctggcaa ataaatctgc tacggagaca tcatttcctc actgtctcaa 12120
 agccataact acctgggagt ctttcaacac agaccctcc gatgggaaat gctgtttatt 12180
 actgaatgca ggatgctcac gctctgatct tttctccctt gtgcctttac cccagtcatt 12240
 tttacttagc aacaccaatt ctagatactt ctgttctgaa gtagaaccac ccccttgcca 12300
 cactgccagt tttcctgcta aaagcagtgg acagaagaca gatcatggtc accctcacia 12360
 acatggcaca cagctgtctc ggtagctgca ttcccagcat gtccctgtct aaatatctag 12420
 agttgcctat gacacgttca aaggttccca agcacagtac attgggaggc ttttgctgct 12480
 gtggccgttg ttttcgttta ggccaactta cttccgtatt cacatactct tggttttacg 12540
 aaatacactc ctccagtcta ctaggccaat caatatattt aaaagtctga ttgccacata 12600
 agtctctctc tctctctttt tgTTTTTgt ttgtttgttt ttttctgttt tggtgcccgg 12660
 tagttaaaga ctgagatagg ttggaagact aaaatacagg agtacetgag tgacaacctt 12720
 cagccgtctg atttccatgc cggtaaaaaca cacaaccaag ctcttcttag cgctgctaatt 12780

ES 2 705 237 T3

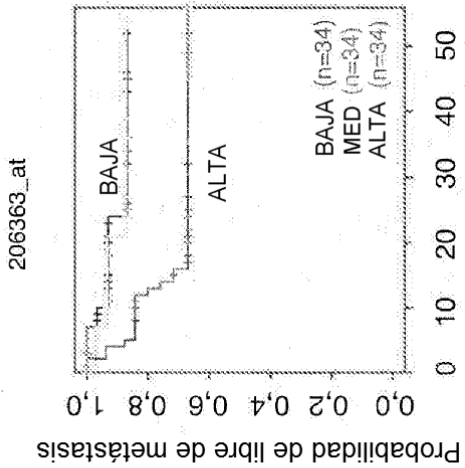
ataaacattc	actaagaggg	aataggaagt	gagatttacc	agcttcactt	tgctgatttg	12840
caaggttccc	cactacgatt	cactgtcatt	tgatttttga	aaaataattt	tgtccgtctc	12900
tttgaagaaa	tgtccttagtt	cttttatttt	gtttgtttgg	tttttttag	agaagtttta	12960
tctgcagtga	taggctacaa	tttttatctc	cgctgattat	ttgtcaggat	gctgaatgaa	13020
taatttggtc	ctgtgccttc	cttgttgttc	tgaggaaaat	aagagaaact	tggaagtttg	13080
tttactctt	agcccatcct	aatctaaaa	gaagatgtcc	caggccagg	caggccatgt	13140
agtagttata	aaggaggtgg	tccaggtcca	gccacctcaa	tcaggatttg	tttgttttga	13200
agcatttgct	taaaagcggg	gcaagagtct	taaccaact	tgccataaca	ctgcttttct	13260
cgcttttgat	gtaaatcttc	aaaattcaga	catcaaacag	ccccagaaaa	ggggaattct	13320
ctccaggcat	tgctccgccc	cagctcctga	acaaaccag	ctctgtctag	catttttttc	13380
cctagcgggg	gtaggggaca	gggtgagaga	atctcagtct	cccaggctgt	ctcatgattg	13440
ttagggcata	aagaaacaca	gtcctgccac	aaattgggag	catctttacc	ctttagagag	13500
aaacaaaaca	aaactaaaca	aacaaatcaa	attgctttgc	atgaaggcgt	agcaaataaa	13560
atctcgggct	ccctgttccc	tgaccattt	gtaggaggtg	agaaatgagg	gaaacaagag	13620
aaaggggaac	tttaaaagcg	ggaggcccag	aaataatccc	tgttaccagt	ctgaatttca	13680
cttgctccgt	ggctaacgtc	agacctagtg	tgcatgtatg	ccagaagtaa	actaggctcg	13740
gctgtccatt	tctttaaaat	atgttcacat	gtttcctttt	tgaaaacaat	tttggggact	13800
aaaccctaat	ggagagattt	gaggaaatcg	ttaatgtott	aacatttgag	tatatttata	13860
aatgtatcag	tctgtgat					13878

REIVINDICACIONES

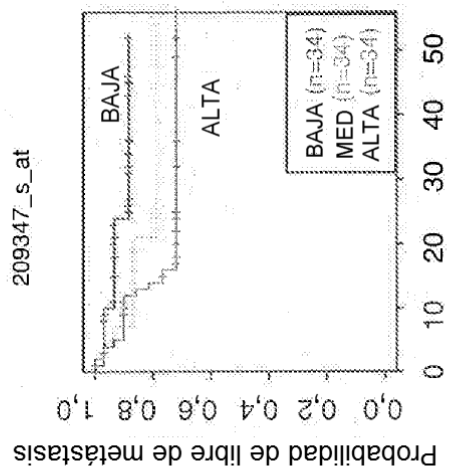
1. Un método *in vitro* para el diagnóstico de metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón y/o para el pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón, que comprende:
- 5 (i) cuantificar el número de copias de c-MAF en una muestra de tumor de dicho sujeto y
(ii) comparar el número de copias obtenido previamente con el número de copias de dicho gen en una muestra de control,
- 10 en el que si el número de copias de dicho gen aumenta con respecto al número de copias de dicho gen en la muestra de control, entonces dicho sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis.
2. Un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto con cáncer de pulmón, que comprende:
- 15 (i) cuantificar la ganancia del número de copias de 16q22-24 en una muestra de tumor de dicho sujeto y
(ii) comparar el número de copias obtenido previamente con el número de copias de dicha región en una muestra de control,
- 20 en el que si el número de copias de 16q22-24 ha crecido con respecto a la muestra de control, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia con el objetivo de prevenir y/o tratar la metástasis.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la terapia dirigida a prevenir y/o tratar la metástasis se selecciona del grupo que consiste en: tratamientos sistémicos que incluyen, aunque sin limitación, quimioterapia, terapia hormonal e inmunoterapia; radioterapia; cirugía; un inhibidor de mTor; un inhibidor de Src cinasa; un inhibidor de COX-2; Alpharadin; o la terapia dirigida a prevenir la metástasis ósea es un antagonista de CCR5.
- 25 4. Un método *in vitro* para diagnosticar metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón y/o para el pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cáncer de pulmón, que comprende determinar si el gen c-MAF está amplificado en una muestra de tumor de dicho sujeto, en el que si dicho gen está amplificado, entonces dicho sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis, en el que la amplificación del gen c-MAF se determina por medio de la determinación de la amplificación del locus 16q22-q24.
- 30 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, en el que la metástasis es metástasis ósea.
- 35 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la metástasis ósea es metástasis osteolítica.
7. Un método *in vitro* para tipar una muestra de un sujeto que padece cáncer de pulmón, comprendiendo el método:
- 40 a) proporcionar una muestra de tumor de dicho sujeto;
b) cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en dicha muestra;
c) tipar dicha muestra comparando el nivel de expresión cuantificado de c-MAF con un nivel de referencia predeterminado de expresión de c-MAF;
- 45 en el que dicho tipado proporciona información de pronóstico relacionada con el riesgo de metástasis ósea en dicho sujeto, en el que si el nivel de expresión de dicho gen aumenta con respecto al nivel de expresión de dicho gen en la muestra de control, entonces dicho sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis.



209348_s_at
 Probabilidad de libre de metástasis
 Tiempo hasta acontecimiento de metástasis
 (n = 102 | cri = 2,892 | valor p = 0,008)*



206363_at
 Probabilidad de libre de metástasis
 Tiempo hasta acontecimiento de metástasis
 (n = 102 | cri = 3,494 | valor p = 0,004)*



209347_s_at
 Probabilidad de libre de metástasis
 Tiempo hasta acontecimiento de metástasis
 (n = 102 | cri = 19,001 | valor p = 0,016)*

sondas de c-MAF
 206363_at
 209348_s_at
 209347_s_at

Figura 1

El valor de corte de expresión de MAF se ajustó a una IHC de D.O. 20000

b.

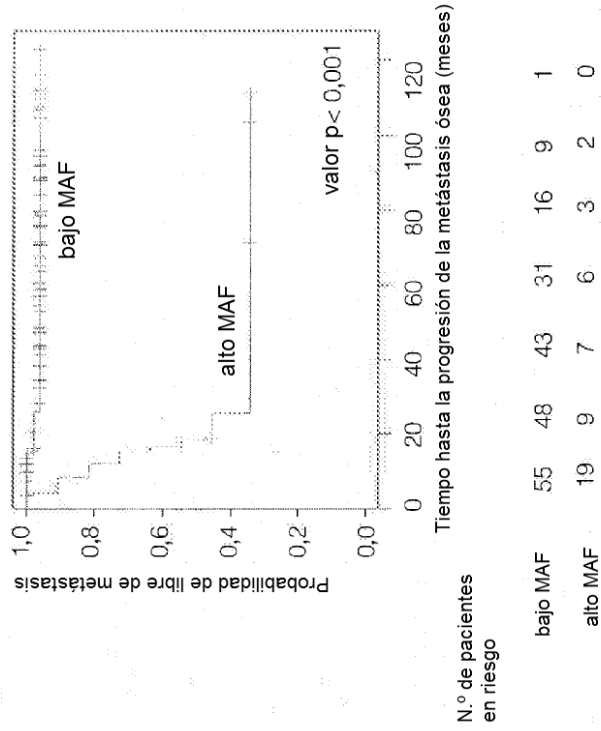
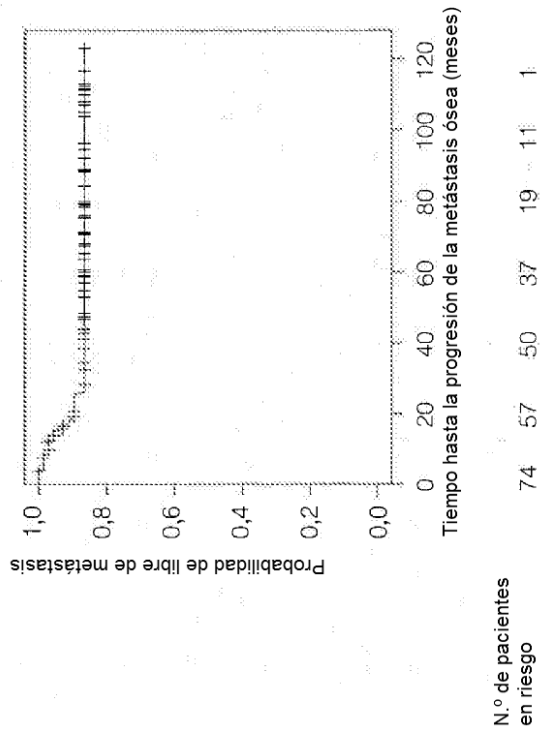


Figura 2

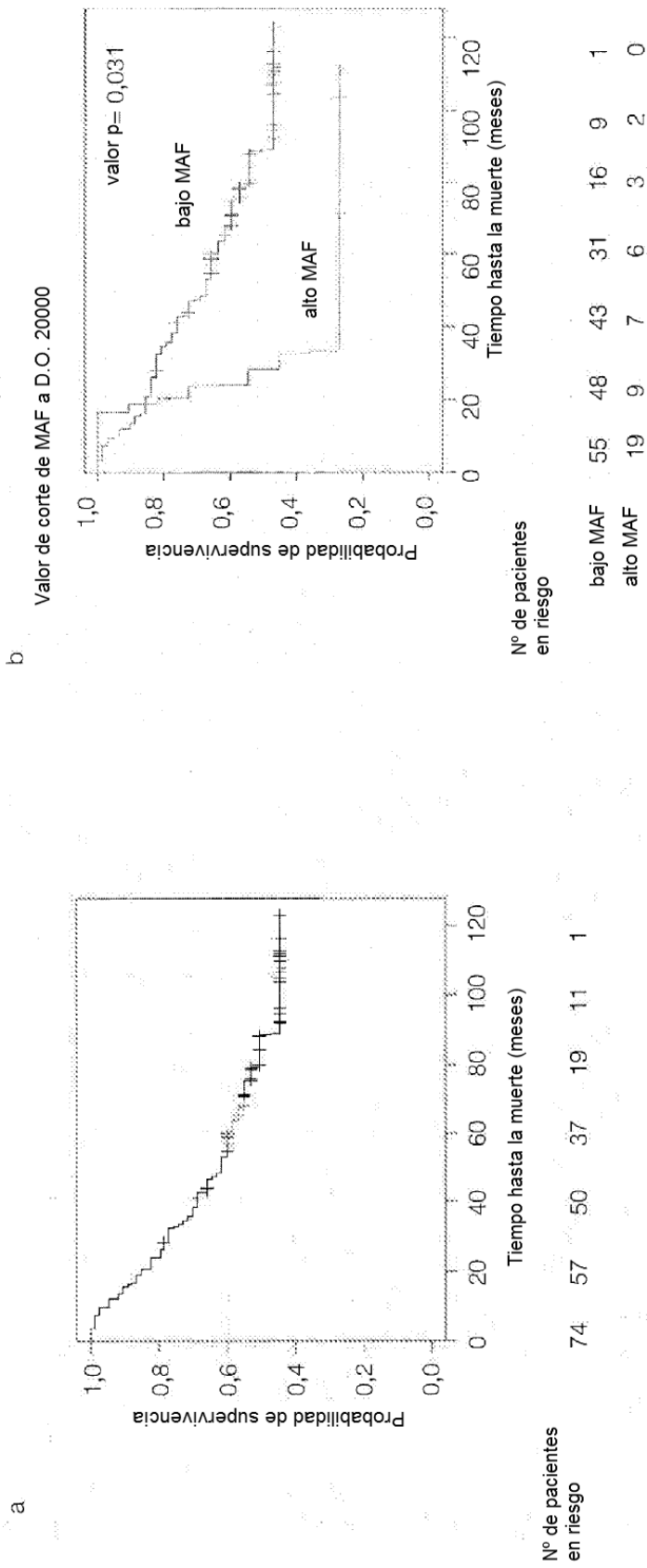


Figura 3