

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 639**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2011 E 15180897 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 3091085**

54 Título: **Método para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la metástasis de cáncer de mama**

30 Prioridad:

06.10.2010 ES 201031478 P
27.06.2011 ES 201131073 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2019

73 Titular/es:

INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS (50.0%)
Passeig Lluís Companys, 23
08010 Barcelona, ES y
FUNDACIÓ INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA (IRB BARCELONA) (50.0%)

72 Inventor/es:

GOMIS CABRÉ, ROGER;
ARNAL ESTAPÉ, ANNA;
PAVLOVIC, MILICA y
TARRAGONA SUNYER, MARIA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 721 639 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, pronóstico y tratamiento de la metástasis de cáncer de mama

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con el diagnóstico o el pronóstico de metástasis en cáncer de mama basado en determinar si el gen c-MAF se encuentra amplificado en una muestra de tumor primario. Asimismo, la invención también se relaciona con un método para el diagnóstico o el pronóstico de metástasis en cáncer de mama, así como con un método para diseñar una terapia personalizada en un sujeto con cáncer de mama, que comprenden determinar el nivel de expresión del gen c-MAF. Por último, la invención se relaciona con el empleo de un inhibidor de c-MAF como diana terapéutica para el tratamiento de la metástasis del cáncer de mama.

15 **Antecedentes de la invención**

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

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

- TX: El tumor primario no se puede evaluar. T0: No hay evidencia de tumor. Tis: Carcinoma *in situ*, no invasión. T1: El tumor es de 2 cm o menos. T2: El tumor es de más de 2 cm pero de menos de 5 cm. T3: El tumor es de más de 5 cm. T4: Tumor de cualquier tamaño que crece en la pared del pecho o piel, o cáncer de mama inflamatorio.
- NX: Los ganglios linfáticos cercanos no se pueden evaluar. N0: El cáncer no se ha extendido a los ganglios linfáticos regionales. N1: El cáncer se ha extendido a 1 a 3 ganglios linfáticos de la axila o a uno mamario interno. N2: El cáncer se ha extendido a 4 a 9 ganglios linfáticos de la axila o a múltiples ganglios mamaros internos. N3: Aplica uno de los siguientes:
 - El cáncer se ha extendido a 10 ó más ganglios linfáticos de la axila, o el cáncer se ha extendido a los ganglios linfáticos bajo la clavícula, o el cáncer se ha extendido a los ganglios linfáticos por encima de la clavícula o el cáncer afecta a los ganglios linfáticos de la axila y se ha extendido a los ganglios linfáticos mamaros internos, o el cáncer afecta a 4 ó más ganglios linfáticos de la axila, y se encuentran cantidades mínimas de cáncer en los ganglios mamaros internos o en biopsia de ganglios linfáticos centinelas.
- MX: La presencia de extensión distante (metástasis) no se puede evaluar. M0: No hay extensión distante. M1: Se ha producido la extensión a órganos distantes, que no incluyen el ganglio linfático supraclavicular.

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

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

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

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

15 La solicitud de patente EP1961825-A1 describe un método para predecir la aparición de metástasis de cáncer de mama a hueso, pulmón, hígado o cerebro, que comprende determinar en una muestra de tejido tumoral el nivel de expresión de uno o más marcadores respecto a su correspondiente nivel de expresión en una muestra control, entre los que se encuentra c-MAF. Sin embargo, este documento requiere la determinación de varios genes simultáneamente para poder determinar la supervivencia de pacientes de cáncer de mama y la correlación entre la capacidad de la firma genómica de predecir la supervivencia libre de metástasis a hueso no resultó estadísticamente significativa.

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

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

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

35 Brufsky (Seminars in Oncology, junio de 2010, 37 (3) Supl. 1 pp. S12-219) discute la terapia de conservación de hueso en pacientes con cáncer de mama.

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

Compendio de la invención

45 La invención está definida por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

50 Los autores de la presente invención han identificado y validado c-MAF como marcador asociado a una mayor propensión del cáncer de mama ER+ a provocar metástasis y, en particular, metástasis al hueso. Esta sobreexpresión se debe al menos en parte a una amplificación del locus 16q22-q24 en el que se encuentra el gen c-MAF. Sin querer estar vinculado a ninguna teoría en particular, se piensa que la vía de señalización del receptor de estrógenos (ER) contribuye a la metástasis del cáncer de mama liderando los eventos moleculares necesarios para que se produzca dicha metástasis.

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

seguido de experimentos de ganancia mediante vectores lentivirales y pérdida de función mediante el empleo de ARN de interferencia (ARNip). Estos estudios han demostrado el papel de c-MAF como marcador de pronóstico y como un gen diana en la metástasis del cáncer de mama, en particular, metástasis al hueso del cáncer de mama. Asimismo, los inventores han asociado la amplificación del locus 16q22-q24, que incluye el gen c-MAF con la presencia de metástasis en sujetos con cáncer de mama y la amplificación del gen c-MAF en líneas celulares de cáncer de mama con tendencia a producir metástasis en hueso.

Así, se describe un método *in vitro* para diagnosticar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+ y/o para pronosticar la propensión a desarrollar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+ que comprende

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

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

Adicionalmente se describe un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto afectado de cáncer de mama ER+ que comprende

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

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

Adicionalmente se describe un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto afectado de cáncer de mama con metástasis en hueso que comprende

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

en donde si los niveles de expresión del gen c-MAF están incrementados respecto a los niveles de expresión de dicho gen en la muestra control, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia dirigida a prevenir la degradación ósea.

Adicionalmente se describe un método *in vitro* para diagnosticar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama y/o para pronosticar la propensión a desarrollar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama que comprende determinar si el gen c-MAF se encuentra amplificado en una muestra de tejido tumoral de dicho sujeto; en donde si existe amplificación de dicho gen respecto a una muestra control, entonces dicho sujeto presenta un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor propensión a desarrollar una metástasis.

Adicionalmente se describe el uso de un agente inhibidor de c-MAF en la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la metástasis de cáncer de mama.

También se describe el uso de un agente capaz de evitar o prevenir la degradación ósea en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la metástasis en hueso en un sujeto que padece cáncer de mama y presenta los niveles de c-MAF elevados en una muestra de tejido tumoral metastásico con respecto a una muestra control.

Breve descripción de las figuras

La **figura 1 (A)** muestra el esquema gráfico del proceso de selección *in vivo* de las subpoblaciones metastásicas tejido-específicas. Cada una de las subsiguientes generaciones metastásicas a hueso es designada BoM0, BoM1 y BoM2. La capacidad metastásica de estos tipos celulares fue analizada mediante inyección intra-cardíaca en un modelo de injerto en ratón inmunodeprimido. **(B)** muestra la agrupación jerárquica obtenida a partir de los perfiles transcripcionales de las células de cáncer de mama ER+ parentales y sus subsiguientes líneas celulares derivadas metastásicas BoM0, BoM1 y BoM2. **(C)** muestra las curvas Kaplan-Meier donde se separan los grupos de pacientes en función de los niveles de expresión de c-MAF y se indica la probabilidad para cada grupo de pacientes de recaída y metástasis al hueso a lo largo del tiempo. El conjunto de datos incluye 560 tumores primarios de cáncer de mama. Los análisis se restringieron a los tumores ER+ y ER- respectivamente (base de datos Gene Expression Omnibus, número de acceso GSE 2603, 2034 y 12276) **(D)** muestra los niveles de expresión de c-MAF que se utilizaron para separar los perfiles de expresión de los 338 tumores de cáncer de mama primarios descritos en la cohorte del NK1. Se muestra de forma comparativa mediante curva Kaplan-Meier la probabilidad de supervivencia de los pacientes de cada grupo a lo largo del tiempo. Los datos p-valor que se muestran en **C** y **D** indican que la intersección entre la expresión del gen c-MAF y el ER, usando estos valores como variables continuas, predice de modo independiente y significativo la recurrencia de metástasis utilizando un modelo multivariante tipo COX (p-valor<0.01).

La **figura 2 (A)** muestra los niveles normalizados de expresión del gen c-MAF en metástasis de hueso originarias de cáncer de mama en comparación con otros sitios de metástasis (cerebro, hígado y pulmón) (GSE14020). **(B)** muestra los niveles normalizados de expresión del gen c-MAF en distintas subpoblaciones con diferente capacidad de colonización del hueso y derivadas de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 (ER-). **(C)** muestra los niveles normalizados de expresión del gen CTGF (gen inducido por la actividad transcripcional de c-MAF) en distintas subpoblaciones con diferente capacidad de colonización del hueso y derivadas de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 (ER-) o con la sobreexpresión exógena del cDNA codificante para el gen MAF (isoforma larga).

La **figura 3 (A)** muestra los análisis de los niveles de expresión de c-MAF en las células de cáncer de mama ER+ MCF7, y sus derivados metastásicos (BoM) mediante RT-PCR cuantitativa. **(B) y (C)** muestran los experimentos de pérdida y ganancia de función de c-MAF. La pérdida y la ganancia de c-MAF se ha realizado en células altamente y poco metastásicas a hueso, respectivamente. Las líneas celulares derivadas con y sin expresión de c-MAF son inyectadas en el ventrículo izquierdo de los ratones inmunodeprimidos y se analiza la colonización a hueso *in vivo* y en tiempo real mediante técnicas de imagen por bioluminiscencia para validar la contribución de c-MAF a la metástasis a hueso en cáncer de mama ER+. MAF-sho indica c-MAF short (isoforma corta).

La **figura 4** muestra el ensayo de diferenciación de osteoclastos a partir de células precursoras derivadas de médula ósea, a partir de medio condicionado procedente de células MCF7 parentales o células que sobre-expresan alguna de las isoformas de c-MAF (short - isoforma corta y long - isoforma larga). El número de osteoclastos se mide mediante la técnica de TRAP. Las diferencias estadísticas entre grupos se evalúan mediante el test de wilcoxon con dos colas.

La **figura 5 (A)** muestra los análisis del número de copias a partir de los niveles de expresión de genes en células BoM2 en comparación con células MCF7, en el cromosoma 16. En la parte superior se muestra un indicador de expresión. En la parte central de la figura se muestran las secuencias de referencia de los transcritos o genes para los que se dispone de valores de expresión (Sec. Ref. Transcritos), que se ordenan en función de su posición genómica; **(B)** muestra el análisis ACE (análisis de alteraciones por número de copias basados en datos de expresión) identifica una ganancia genómica recurrente en la región 16q12-q24 en pacientes de cáncer de mama con metástasis en 348 tumores primarios de cáncer de mama ER+. Dicha región incluye el locus 16q22-q24 que contiene el gen c-MAF. La expresión de los genes y el desarrollo de metastasis se han asociado aplicando el modelo "Cox log hazard ratio (HR)". La significancia estadística se ha obtenido permutando (1000 permutaciones) el logaritmo del HR en todo el genoma, ajustando los valores p via Benjamini-Hochberg para controlar un FDR (ratio de falsos positivos) a nivel de 0,05. Sólo se reportan en gris aquellas regiones con al menos 15 genes significativos consecutivos.

La **figura 6 (A)** muestra la detección del número de copia de gen MAF e IGH mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) usando una sonda específica del gen c-MAF (flecha con asteriscos) y una sonda específica de gen IGH (flechas). El gen IGH se emplea como control. Escala: 25 μ m. **(B)** muestra la cuantificación del porcentaje de células con el ratio indicado entre el número de copia del gen MAF en comparación con el número de copia del gen IGH (se indica el número total de células contadas para cada grupo).

Descripción detallada de la invención

45 MÉTODOS DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE METÁSTASIS EN CÁNCER DE MAMA BASADOS EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE c-MAF

Los inventores han puesto de manifiesto que el gen c-MAF está sobre-expresado en metástasis de cáncer de mama, en particular en tumores ER+, así como que los niveles de expresión de c-MAF en tumores primario se correlacionan con distintos parámetros clínicos del cáncer de mama, en particular, con recurrencia y probabilidad de metástasis. Así, según se observa en los ejemplos de la presente invención (véase Ejemplo 2), la sobreexpresión de c-MAF se correlaciona con la aparición de metástasis de tumores de mama ER+ en hueso (véase Figura 1). Por tanto, c-MAF puede emplearse como marcador para diagnosticar y/o pronosticar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+.

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

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

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

65

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

En el contexto de la presente divulgación, se entiende por “metástasis” a la propagación de un cáncer a un órgano distinto de aquel en el que se inició. Ocurre generalmente por vía sanguínea o linfática. Cuando las células cancerosas se diseminan y forman un tumor nuevo, éste se llama un secundario, o tumor metastásico. Las células del cáncer que forman el tumor secundario son como las del tumor original. Por ejemplo, si un cáncer de mama se disemina (metastatiza) al pulmón, el tumor secundario está formado de células malignas del cáncer de mama. La enfermedad en el pulmón es cáncer de mama metastásico y no cáncer de pulmón. En una realización particular del método descrito, la metástasis es cáncer de mama ER+ que se ha diseminado (metastatizado) al hueso.

En la presente divulgación, se entiende por “cáncer de mama ER+” al cáncer de mama cuyas células tumorales expresan el receptor de estrógeno (ER). Esto hace a dichos tumores sensibles a los estrógenos, lo cual significa que el estrógeno hace que el tumor canceroso mamario crezca. Por el contrario, se entiende por “cáncer de mama ER-” al cáncer de mama cuyas células tumorales no expresan el receptor de estrógeno (ER).

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

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

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

En una realización preferida, el primer método descrito comprende cuantificar sólo el nivel de expresión del gen c-MAF como un marcador único, por ejemplo, el método no incluye determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional.

El término “sujeto” o “paciente”, como se usa aquí, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no está restringido a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

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

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

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

Así, la cuantificación del nivel de expresión del gen c-MAF puede realizarse a partir del ARN resultante de la transcripción de dicho gen (ARN mensajero o ARNm) o, alternativamente, a partir del ADN complementario (ADNc)

de dicho gen. Por tanto, en una realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión del gen c-MAF comprende la cuantificación del ARN mensajero del gen c-MAF, o un fragmento de dicho ARNm, ADN complementario del gen c-MAF, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.

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

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

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

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

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

55 El nivel de expresión de la proteína c-MAF puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dicha proteína pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a c-MAF (o a fragmentos de la misma que contenga un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas

inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como *dipsticks*. Otras maneras para detectar y cuantificar dicha proteína c-MAF, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc. Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe se une a la proteína c-MAF con alta afinidad para detectar la cantidad de la misma. Sin embargo, se prefiere el uso de un anticuerpo, por ejemplo, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados. En el mercado, existen anticuerpos comerciales contra la proteína c-MAF que pueden emplearse, como por ejemplo, los anticuerpos ab427, ab55502, ab55502, ab72584, ab76817, ab77071 (Abcam plc, 330 Science Park, Cambridge CB4 0FL, United Kingdom), el anticuerpo monoclonal O75444 (Mouse Anti-Human MAF Azide free Monoclonal antibody, Unconjugated, Clone 6b8) de AbD Serotec, etc. Son múltiples las casas comerciales que ofrecen anticuerpos anti-c-MAF, como Abnova Corporation, Bethyl Laboratories, Bioworld Technology, GeneTex, etc.

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

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

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

La determinación de los niveles de expresión del gen c-MAF necesita ser correlacionada con valores de una muestra control o muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor que está siendo objeto de análisis, la naturaleza exacta de la muestra control puede variar. Así, en el caso de que se trate de evaluar el diagnóstico, entonces la muestra de referencia es una muestra de tejido tumoral de un sujeto con cáncer de mama ER+ que no ha sufrido metástasis o que corresponden al valor mediana de los niveles de expresión del gen c-MAF medidos en una colección de tejidos tumorales en muestras de biopsias de sujetos con cáncer de mama ER+ que no han sufrido metástasis.

Dicha muestra de referencia se obtiene típicamente combinando cantidades iguales de muestras de una población de sujetos. En general, las muestras de referencia típicas se obtendrán de sujetos que están clínicamente bien documentados y en los que la ausencia de metástasis se encuentra bien caracterizada. En tales muestras, las concentraciones normales (de referencia) del biomarcador (gen c-MAF) se pueden determinar, por ejemplo proporcionando la concentración media sobre la población de referencia. Al determinar la concentración de referencia del marcador se toman en cuenta varias consideraciones. Entre tales consideraciones están la edad, peso, sexo, estado físico general del paciente y similares. Por ejemplo, se toman como grupo de referencia cantidades iguales de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 a preferiblemente más de 1000 sujetos, preferiblemente clasificados según las consideraciones anteriores, por ejemplo de varias categorías de edad. La colección de muestras de las que deriva el nivel de referencia estará preferiblemente constituida por sujetos que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente objeto de estudio.

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

En la presente divulgación se entiende por "niveles de expresión incrementados" cuando el nivel de expresión se refiere a niveles del gen c-MAF superiores a los que aparecen en una muestra de referencia o muestra control. En

particular, se puede considerar que una muestra presenta niveles altos de expresión de c-MAF cuando los niveles de expresión en la muestra de referencia son de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a la muestra aislada del paciente.

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

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

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

20 El experto en la materia entenderá que la predicción de la propensión a sufrir metástasis a partir de un tumor primario de mama no se pretende que sea correcta para todos los sujetos que van a identificar (es decir, para el 100% de los sujetos). Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos pueda identificarse (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohorte). Si una parte es estadísticamente significativa puede determinarlo de manera sencilla el experto en la materia usando varias herramientas de evaluación estadísticas bien conocidas, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, determinación de valores de p, prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Se proporcionan detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley and Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Más preferiblemente, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% de los sujetos de una población se puede identificar apropiadamente por el método de la presente divulgación.

35 MÉTODO DE DISEÑO DE TERAPIA PERSONALIZADA DE LA INVENCIÓN EN PACIENTES CON TUMORES DE MAMA ER+

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

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

45 Así, se describe un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto afectado de cáncer de mama ER+, que comprende

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

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

55 En una realización particular, la metástasis es metástasis en hueso. En una realización más preferida, la metástasis en hueso es metástasis osteolítica.

60 Los términos y expresiones “sujeto”, “cáncer de mama ER+”, “muestra de tejido tumoral”, “metástasis”, “determinación de niveles de expresión”, “gen c-MAF”, “niveles de expresión incrementados” y “muestra control” han sido descritos en detalle en relación con el método descrito anteriormente y son igualmente aplicables a los otros métodos descritos.

El segundo método descrito comprende, en una primera etapa, cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tejido tumoral en un sujeto que padece cáncer de mama ER+.

En una realización preferida, el segundo método comprende cuantificar sólo el nivel de expresión del gen c-MAF como un único marcador, por ejemplo, el método no incluye determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional.

- 5 En el caso del segundo método la muestra es una muestra de tejido tumoral primario del sujeto. En una segunda etapa, se compara el nivel de expresión del gen c-MAF obtenido en la muestra tumoral del sujeto con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra control. La determinación de los niveles de expresión del gen c-MAF necesita ser correlacionada con valores de una muestra control o muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor que está siendo objeto de análisis, la naturaleza exacta de la muestra control puede variar. Así, preferentemente, la muestra de referencia es una muestra de tejido tumoral de sujeto con cáncer de mama ER+ que no ha sufrido metástasis o que corresponden al valor mediana de los niveles de expresión del gen c-MAF medidos en una colección de tejidos tumorales en muestras de biopsias de sujetos con cáncer de mama ER+ que no ha sufrido metástasis.
- 10
- 15 Una vez medidos los niveles de expresión del gen c-MAF en la muestra y comparados con la muestra control, si los niveles de expresión de dicho gen están incrementados respecto a sus niveles de expresión en la muestra control, entonces se puede concluir que dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia dirigida a evitar (si el sujeto aún no ha sufrido metástasis) y/o tratar la metástasis (si el sujeto ya ha sufrido metástasis).
- 20 Cuando el cáncer ha producido metástasis, se emplean tratamientos sistémicos entre los que se incluyen, sin limitar a, quimioterapia, tratamiento hormonal, inmunoterapia, o una combinación de éstos. Adicionalmente, puede emplearse radioterapia y/o cirugía. La elección del tratamiento depende generalmente del tipo de cáncer primario, del tamaño, la localización de la metástasis, la edad, la salud general del paciente y los tipos de tratamientos usados previamente.
- 25 Los tratamientos sistémicos son aquellos que llegan a todo el cuerpo:
- La quimioterapia es el uso de medicamentos para destruir las células cancerosas. Por lo general, los medicamentos se administran vía oral o intravenosa. En ocasiones, la quimioterapia es utilizada junto con el tratamiento con radiación.
 - 30 - La terapia hormonal se basa en que algunas hormonas promueven el crecimiento de algunos cánceres. Por ejemplo, el estrógeno en la mujer, que es producido por los ovarios, a veces promueve el crecimiento del cáncer de mama. Existen varias formas de detener la producción de estas hormonas. Una forma es extirpar los órganos que las producen: los ovarios en el caso de las mujeres, los testículos en el caso de los hombres. Más frecuentemente, se pueden usar medicamentos para impedir que estos órganos produzcan las hormonas o para evitar que las hormonas actúen sobre las células cancerosas.
 - 35 - La inmunoterapia es un tratamiento que ayuda al propio sistema inmunitario del paciente para combatir el cáncer. Hay varios tipos de inmunoterapia que se utilizan para tratar los pacientes con metástasis. Estos incluyen, pero no se limitan a, citocinas, anticuerpos monoclonales y vacunas antitumorales.

40 MÉTODO DE DISEÑO DE TERAPIA PERSONALIZADA EN PACIENTES DE CÁNCER DE MAMA CON METÁSTASIS ÓSEA

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que el medio condicionado de líneas celulares derivadas de tumores de mama primarios y que presentar alta capacidad de dar lugar a metástasis en hueso y que sobre-expresan c-MAF son capaces de inducir la formación osteoclastos en mayor grado que las células que no sobre-expresan c-MAF. Así, aquellos pacientes que sufren cáncer de mama ER- que ya ha metastatizado a hueso y en los que aparecen niveles elevados de c-MAF, se pueden beneficiar particularmente de terapias encaminadas de evitar la degradación ósea causada por la actividad osteoclástica aumentada.

- 50 Así, se describe un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto afectado de cáncer de mama ER- con metástasis en hueso que comprende
- (i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tejido tumoral metastásico de hueso de dicho sujeto y
 - (ii) comparar el nivel de expresión previamente obtenido con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra control,
- 55 en donde si los niveles de expresión están incrementados respecto a los niveles de expresión de dicho gen en la muestra control, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia dirigida a prevenir la degradación ósea.

Los términos y expresiones "sujeto", "cáncer de mama ER+", "muestra de tejido tumoral", "metástasis", "determinación de niveles de expresión", "gen c-MAF", "niveles de expresión incrementados" y "muestra control" han sido descritos en detalle en relación con el método descrito anteriormente y son igualmente aplicables a los otros métodos descritos de la invención.

En una realización preferida, la metástasis en hueso es metástasis osteolítica.

65

El tercer método descrito comprende, en una primera etapa, cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tejido tumoral en un sujeto que padece cáncer de mama. En el caso del tercer método de la invención, la muestra es una muestra de tejido de metástasis en hueso.

5 En una realización preferida, el tercer método comprende cuantificar sólo el nivel de expresión del gen c-MAF como un único marcador, por ejemplo, el método no incluye determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional.

En una segunda etapa, se compara el nivel de expresión del gen c-MAF obtenido en la muestra tumoral del sujeto con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra control. La determinación de los niveles de expresión del gen c-MAF necesita ser correlacionada con valores de una muestra control o muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor que está siendo objeto de análisis, la naturaleza exacta de la muestra control puede variar. Así, en el caso de que se trate del tercer método, entonces la muestra de referencia es una muestra de tejido tumoral de sujeto con cáncer de mama que no ha sufrido metástasis o que corresponde al valor mediana de los niveles de expresión del gen c-MAF medidos en una colección de tejidos tumorales en muestras de biopsias de sujetos con cáncer de mama que no ha sufrido metástasis.

Una vez medidos los niveles de expresión del gen c-MAF en la muestra y comparados con la muestra control, si los niveles de expresión de dicho gen están incrementados respecto a sus niveles de expresión en la muestra control, entonces se puede concluir que dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia dirigida a evitar o prevenir la degradación ósea.

Un "agente para evitar o prevenir la degradación ósea", según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier molécula capaz de tratar o frenar la degradación ósea, ya sea estimulando la proliferación de los osteoblastos o inhibiendo la proliferación de los osteoclastos. Ejemplos ilustrativos de agentes utilizados para evitar y/o prevenir la degradación ósea incluyen, aunque no se limitan:

- Hormona paratiroidea (PTH) o formas recombinantes de la misma (Teriparatida, que corresponde a los aminoácidos 1-34 de PTH). Esta hormona actúa estimulando los osteoblastos e incrementando su actividad.
- 30 - Ranelato de estroncio: es una alternativa de tratamiento oral, y forma parte del grupo de fármacos llamados "agentes óseos de acción dual" (acrónimo en inglés: DABAs) ya que estimulan la proliferación de osteoblastos e inhiben la proliferación de osteoclastos.
- "Moduladores del receptor de estrógenos" (SERM) se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de estrógenos al receptor, con independencia del mecanismo. Ejemplos de moduladores del receptor de estrógenos incluyen, entre otros, estrógenos progestágeno, estradiol, droloxifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, TSE-424, tamoxifeno, idoxifeno, L Y353381, LY117081, toremifeno, fluvestrant, 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.
- 35 - 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 utilizados para la prevención y el tratamiento de enfermedades con resorción o reabsorción ósea, como la osteoporosis y el cáncer con metástasis ósea, sea éste con o sin hipercalcemia, asociadas al cáncer de mama y de próstata. Ejemplos de bifosfonatos que se pueden utilizar en la terapia diseñada mediante el tercer método incluyen, aunque no se limitan a, bifosfonatos nitrogenados (tal como pamidronato, neridronato, olpadronato, alendronato, ibandronato, risedronato, incadronato, zoledronato o ácido zoledrónico, etc.) y bifosfonatos no nitrogenados (tal como etidronato, clodronato, tiludronato, etc.).
- 40 - "Inhibidores de la catepsina K" se refiere a compuestos que interfieren en la actividad de la cisteína proteasa catepsina K. Ejemplos no limitantes de inhibidores de catepsina K incluyen derivados de 4-amino-pirimidino-2-carbonitrilo (descritos en la Solicitud de Patente Internacional WO 03/020278 a nombre de Novartis Pharma GMBH), pirrolo-pirimidinas descritos 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.
- 45 - "Inhibidores de RANKL", según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier compuesto que es capaz de provocar una disminución en la actividad de RANK. RANKL se encuentra en la superficie de la membrana de los osteoblastos, de las células del estroma y de los linfocitos T, y estos últimos son los únicos en los que se ha demostrado la capacidad de secretarla. Su principal función 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 provocando una disminución de la expresión de RANKL bloqueando la transcripción o la traducción de RANKL. Antagonistas o inhibidores de RANKL adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen sin limitación:
 - 50 o una proteína de RANK adecuada que es capaz de unir RANKL y que comprende todo o un fragmento del dominio extracelular de una proteína de RANK. El RANK soluble puede comprender

el péptido señal y el dominio extracelular de los polipéptidos de RANK murino o humano, o, alternativamente, se puede utilizar la forma madura de la proteína con el péptido señal eliminado.

- Osteoprotegerina o una variante de la misma con capacidad de unirse a RANKL.
- Moléculas antisentido específicas para RANKL
- Ribozimas con capacidad de procesar los transcritos de RANKL
- Anticuerpos específicos anti-RANKL. Por "anticuerpo anti- RANKL o anticuerpo dirigido contra RANKL" se entiende en el contexto de la presente invención todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse al ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) de manera específica provocando la inhibición de una o más funciones de RANKL. Los anticuerpos pueden ser preparados usando cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la materia. Así, los anticuerpos policlonales se preparan mediante inmunización de un animal con la proteína que se desea inhibir. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Kohler, Milstein y col. (Nature, 1975, 256: 495). Anticuerpos adecuados en el contexto de la presente divulgación incluyen anticuerpos intactos que comprenden una región variable de unión a antígeno y una región constante, fragmentos "Fab", "F(ab')₂" y "Fab", Fv, scFv, diabodies y anticuerpos biespecíficos.

En una realización preferida, el anticuerpo anti-RANKL es un anticuerpo monoclonal. En una realización aún más preferida, 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 invención, Denosumab es un anticuerpo monoclonal que se une a RANKL e impide su activación (no se une al receptor RANK).

En una realización preferida, el agente que previene la degradación ósea es un bifosfonato. En una realización aún más preferida, el bifosfonato es el ácido zoledrónico.

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

MÉTODO DE DIAGNÓSTICO O PRONÓSTICO DE METÁSTASIS EN CÁNCER DE MAMA BASADOS EN LA DETECCIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN c-MAF

Los autores de la invención han identificado qué líneas celulares derivadas de tumores de mama ER+ que presentan una alta capacidad metastásica muestran una amplificación del locus 16q22-q24, que incluye el locus correspondiente al gen c-MAF y una amplificación del gen c-MAF.

Así, se describe un método *in vitro* para diagnosticar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama y/o para pronosticar la propensión a desarrollar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama que comprende determinar si el gen c-MAF se encuentra amplificado en una muestra de tejido tumoral de dicho sujeto; en donde si existe amplificación de dicho gen respecto a una muestra control, entonces dicho sujeto presenta un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor propensión a desarrollar una metástasis.

En una realización particular, el cáncer de mama diagnosticado en el cuarto método es cáncer de mama ER+ o ER-.

Los términos "gen c-MAF", "metástasis", "muestra de tejido tumoral", "cáncer de mama ER+", "diagnóstico de metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+", "pronosticar la propensión a desarrollar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama ER+", "sujeto", "paciente", "sujeto que presenta un diagnóstico positivo de metástasis", "sujeto que presenta una mayor propensión a desarrollar metástasis" han sido descritos en detalle en el contexto del primer método y son igualmente aplicables al cuarto método.

En una realización particular, el grado de amplificación del gen c-MAF puede determinarse mediante la determinación de la amplificación de una región cromosómica que contenga dicho gen. En una forma preferida, la región cromosómica cuya amplificación es indicativa de la existencia de amplificación del gen c-MAF es el locus 16q22-q24, que incluye el gen c-MAF. El locus 16q22-q24 se encuentra localizado 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 se corresponde en la base de datos del NCBI con los contigios NT_010498.15 y NT_010542.15. En otra realización preferida, el grado de amplificación del gen c-MAF puede determinarse mediante el uso de una sonda específica para dicho gen.

El cuarto método diagnóstico/pronóstico comprende, en una primera etapa, determinar si el gen c-MAF se encuentra amplificado en una muestra de tejido tumoral de un sujeto. Para ello, se compara la amplificación del gen c-MAF en la muestra tumoral con respecto a una muestra control.

El término "amplificación de un gen", tal como se entiende en la presente invención, se refiere a un proceso por el cual múltiples copias de un gen o de un fragmento génico se forman en una célula particular o una línea celular. Las copias del gen no están necesariamente localizadas en el mismo cromosoma. La región duplicada se denomina

frecuentemente 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.

5 En una realización particular, el cuatro método para diagnosticar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama y/o para pronosticar la propensión a desarrollar metástasis en un sujeto afectado de cáncer de mama, comprende determinar el número de copias del gen c-MAF en una muestra de tejido tumoral de dicho sujeto y comparar dicho número de copias con el número de copias de una muestra control o referencia., en donde si el número de copias de c-MAF es mayor con respecto al número de copias de c-MAF de una muestra control, entonces el sujeto presenta un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor propensión a desarrollar una metástasis.

10 La muestra control se refiere a una muestra de tejido tumoral de un sujeto con cáncer de mama ER+ o ER- (según el tipo de cáncer que sufra el sujeto) que no ha sufrido metástasis o que corresponden al valor mediana de número de copias del gen c-MAF medidos en una colección de tejidos tumorales en muestras de biopsias de sujetos con cáncer de mama ER+ o ER- que no han sufrido metástasis. Dicha muestra de referencia se obtiene típicamente combinando cantidades iguales de muestras de una población de sujetos. Si el número de copias del gen c-MAF se encuentra incrementado con respecto al número de copias de dicho gen en la muestra control, entonces dicho sujeto presenta un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor propensión a desarrollar una metástasis.

20 El término “número de copias de un gen”, tal como se usa en la presente invención, se refiere al número de copias de una molécula de ácido nucleico en una célula. El número de copias de un gen incluye el número de copias de un gen en el ADN genómico (cromosómico) de una célula. En una célula normal (no tumoral), el número de copias de un gen es normalmente dos copias (una copia en cada miembro del par cromosómico). El número de copias de un gen incluye algunas veces una media del número de copias de un gen tomado a partir de muestras de una población celular.

25 En la presente divulgación se entiende por “número de copias del gen incrementado” cuando el número de copias del gen c-MAF es superior al número de copias que presenta una muestra de referencia o muestra control. En particular, se puede considerar que una muestra presenta número de copias de c-MAF incrementados cuando el número de copias es mayor que 2 copias, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 copias, e incluso mayor que 10 copias del gen c-MAF.

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

35 Métodos para determinar si el gen c-MAF o la región cromosómica 16q22-q24 se encuentra amplificada son conocidos ampliamente en el estado de la técnica. Dichos métodos incluyen, sin limitación, hibridación *in situ* (del inglés, ISH) (tal como hibridación *in situ* fluorescente (del inglés, FISH), cromogénica (del inglés, CISH) o con plata (del inglés, SISH)), hibridación comparativa genómica o reacción en cadena de la polimerasa (tal como PCR cuantitativa a tiempo real). Para cualquier método ISH, la amplificación o el número de copias se puede determinar contando el número de puntos fluorescentes, coloreados o de plata en los cromosomas o en el núcleo.

40 La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) es una técnica citogenética que se utiliza para detectar y localizar la presencia o ausencia de secuencias específicas de ADN en cromosomas. FISH utiliza sondas fluorescentes que se unen únicamente a aquellas partes del cromosoma con las que muestran un alto grado de similitud de secuencia. En un método típico de FISH, la sonda de ADN se etiqueta con una molécula fluorescente o un hapteno, típicamente en forma de fluor-dUTP, digoxigenina-dUTP, biotina-dUTP o hapteno-dUTP, que se incorpora en el ADN empleando reacciones enzimáticas, tal como traducción por cortes (*Nick translation*) o PCR. La muestra que contiene el material genético (los cromosomas) se sitúa en portas de vidrio y se desnaturaliza por un tratamiento de formamida. La sonda marcada se hibrida entonces con la muestra que contiene el material genético bajo condiciones adecuadas, que serán determinadas por el experto en la materia. Tras la hibridación, la muestra se visualiza bien directamente (en el caso de una sonda marcada con fluor) o bien indirectamente (utilizando anticuerpos marcados fluorescentemente para detectar el hapteno).

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

55 Cualquier molécula de marcado o etiqueta que se pueda unir a un ADN se puede utilizar para etiquetar las sondas utilizadas en el cuarto método, permitiendo así la detección de moléculas de ácidos nucleicos. Ejemplos de etiquetas para el marcaje incluyen, aunque no se limitan a, isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, co-factores, ligandos, agentes quimioluminiscentes, fluoróforos, haptenos, enzimas y combinaciones de estos. Métodos para el marcaje y guía para la elección de marcajes adecuados para diferentes propósitos se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989) y Ausubel *et al.* (In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1998).

65

Una vez determinada la existencia de amplificación, bien determinando directamente la amplificación del gen c-MAF o bien determinando la amplificación del locus 16q22-q24, y tras haber comparado con la amplificación de dicho gen en la muestra control, en caso de que se detecte amplificación en el gen c-MAF, es indicativo de que dicho sujeto presenta un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor propensión a desarrollar una metástasis.

5 La determinación de la amplificación del gen c-MAF necesita ser correlacionada con valores de una muestra control o muestra de referencia que corresponden al nivel de amplificación del gen c-MAF medido en una muestra de tejido tumoral de un sujeto con cáncer de mama que no ha sufrido metástasis o que corresponden al valor mediana de la amplificación del gen c-MAF medidos en una colección de tejidos tumorales en muestras de biopsias de sujetos con
10 cáncer de mama que no han sufrido metástasis. Dicha muestra de referencia se obtiene típicamente combinando cantidades iguales de muestras de una población de sujetos. En general, las muestras de referencia típicas se obtendrán de sujetos que están clínicamente bien documentados y en los que la ausencia de metástasis se encuentra bien caracterizada. La colección de muestras de las que deriva el nivel de referencia estará preferiblemente constituida de sujetos que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente objeto de estudio. Una
15 vez que se ha establecido este valor mediana, se puede comparar el nivel de amplificación de c-MAF en tejidos tumorales de pacientes con este valor mediana, y de esta manera, si existe amplificación, el sujeto presenta un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor propensión a desarrollar una metástasis.

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

25 MÉTODOS TERAPÉUTICOS

TRATAMIENTO DE LA METÁSTASIS ÓSEA USANDO AGENTES INHIBIDORES DE C-MAF

30 Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que la inhibición de la expresión de c-MAF en células de cáncer de mama causa una reducción estadísticamente significativa en la formación de metástasis ósea a partir de dichas células, usando con tal fin un modelo experimental de xenotransplante. Por el contrario, la sobreexpresión de c-MAF en células tumorales en ese mismo sistema provoca un aumento en la capacidad metastásica de dichas células. Así, un agente inhibidor de la expresión del gen c-MAF o un agente inhibidor de la proteína codificada por
35 dicho gen puede emplearse en el tratamiento y/o la prevención de la metástasis de cáncer de mama.

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

45 Un "agente inhibidor de c-MAF", según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier molécula capaz de inhibir total o parcialmente la expresión del gen c-MAF, tanto impidiendo que se produzca el producto de expresión de dicho gen (interrumpiendo la transcripción del gen c-MAF y/o bloqueando la traducción del ARNm procedente de la expresión del gen c-MAF) como directamente inhibiendo la actividad de la proteína c-MAF. Inhibidores de la
50 expresión del gen c-MAF pueden identificarse usando métodos basados en la capacidad del supuesto inhibidor de bloquear la capacidad de c-MAF para promover la proliferación celular *in vitro*, tal como se muestra en la solicitud de patente internacional WO2005/046731, basados en la capacidad del supuesto inhibidor para bloquear la capacidad la transcripción de un gen reportero bajo el control del promotor de ciclina D2 o de un promotor que contenga la región de respuesta a c-MAF (MARE o c-MAF *responsive element*) en células que expresan c-MAF tal y como se describe en WO2008098351 o basados en la capacidad del supuesto inhibidor de bloquear la expresión de un gen
55 reportero bajo el control del promotor de IL-4 en respuesta a la estimulación con PMA/ionomicina en células que expresan NFATc2 y c-MAF tal y como se describe en US2009048117A.

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

Oligonucleótidos antisentido

65 Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de ácidos nucleicos "antisentido" aislados para inhibir la expresión, por ejemplo inhibiendo la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico que codifica c-MAF cuya actividad se desea inhibir. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden unir a la diana potencial de la droga mediante

complementariedad de bases convencional o, por ejemplo, en el caso de unirse a ADN bicatenario, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. En general, estos métodos se refieren al rango de técnicas generalmente empleadas en la técnica e incluyen cualquier método que se basa en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

5 Una construcción antisentido se puede distribuir, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que es complementario a al menos una parte única del ARNm celular que codifica c-MAF. De forma alternativa, la construcción antisentido es una sonda de oligonucleótidos que se genera *ex vivo* y que, cuando se introduce en la célula, produce inhibición de la expresión génica hibridando con el ARNm y/o
10 secuencias genómicas de un ácido nucleico diana. Tales sondas de oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados, que son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y que son por lo tanto estables *in vivo*. Moléculas de ácidos nucleicos ejemplares para su uso como oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN de fosforamidoato, fosfotionato y metilfosfonato (ver también las patentes de EE.UU. Nos. 5176996; 5264564; y 5256775). Adicionalmente, se han revisado las aproximaciones
15 generales para construir oligómeros útiles en la terapia antisentido, por ejemplo, en Van der Krol et al., *BioTechniques* 6: 958-976, 1988; y Stein et al., *Cancer Res* 48: 2659-2668, 1988.

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

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

35 Se prefiere que se realicen primero estudios *in vitro* para cuantificar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de inhibir la expresión génica. Se prefiere que estos estudios utilicen controles que distingan entre inhibición génica antisentido y efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También se prefiere que esos estudios comparen los niveles del ARN o proteína diana con el de un control interno de ARN o proteína. Los resultados obtenidos usando los oligonucleótidos antisentido se pueden comparar con los obtenidos usando un oligonucleótido
40 control. Se prefiere que el oligonucleótido control sea aproximadamente de la misma longitud que el oligonucleótido a ensayar y que la secuencia del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo que sea necesario para prevenir la hibridación específica a la secuencia diana.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser de ADN o ARN o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena sencilla o de cadena doble. El oligonucleótido se puede modificar en el grupo de la base, el grupo del azúcar o el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a receptores de células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular (ver, por ejemplo, Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 648-652, 1987; Publicación de PCT No. WO88/09810) o la barrera hematoencefálica (ver, por ejemplo, publicación de PCT No. WO89/10134), agentes intercalantes (ver, por ejemplo, Zon, *Pharm. Res.* 5: 539-549, 1988). Para este fin, el oligonucleótido puede estar conjugado a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente transportador, agente de corte desencadenado por hibridación, etc.
50

Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos un grupo de base modificada. El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un grupo azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye pero no está limitado a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y hexosa. El oligonucleótido antisentido también puede contener un esqueleto semejante a péptido neutro. Tales moléculas se denominan oligómeros ácido nucleico peptídico (ANP) y se describen, por ejemplo, en Perry-O'Keefe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 14670, 1996, y en Eglom et al., *Nature* 365: 566, 1993.
60

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

65

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

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

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

15 ARNip

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

25 Los ARNip empleados son sustancialmente homólogos al ARNm del gen que codifica c-MAF o a la secuencia genómica que codifica dicha proteína. Por "sustancialmente homólogos" se entiende que tienen una secuencia que es suficientemente complementaria o similar al ARNm diana, de forma que el ARNip sea capaz de provocar la degradación de éste por interferencia de ARN. Los ARNip adecuados para provocar dicha interferencia incluyen ARNip formados por ARN, así como ARNip que contienen distintas modificaciones químicas tales como:

- 30
- ARNip en los que los enlaces entre los nucleótidos son distintos a los que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces fosforotioato.
 - conjugados de la cadena de ARN con un reactivo funcional, tal como un fluoróforo.
 - 35 - Modificaciones de los extremos de las cadenas de ARN, en particular el extremo 3' mediante la modificación con distintos grupos funcionales del hidroxilo en posición 2'.
 - Nucleótidos con azúcares modificados tales como restos O-alkilados en posición 2' tales como 2'-O-metilribosa p 2'-O-fluorosibosa.
 - Nucleótidos con bases modificadas tales como bases halogenadas (por ejemplo 5-bromouracilo y 5-iodouracilo), bases alquiladas (por ejemplo 7-metilguanosina).

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

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

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

Promotores adecuados para su uso en la expresión de ARNip a partir de vectores de expresión convergentes o divergentes incluye cualquier promotor o pareja de promotores compatible con las células en las que se desea expresar los ARNip. Así, promotores adecuados para la presente divulgación incluyen, sin estar necesariamente limitados, promotores constitutivos tales como los derivados de los genomas de virus eucariotas tales como el virus del poliovirus, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de la metalotioneína, el promotor del gen de la timidina kinasa del virus del herpes simplex, regiones LTR de los retrovirus, el promotor del gen de la inmunoglobulina, el promotor del gen de la actina, el promotor del gen EF-1alpha así como promotores inducibles en los que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o de una señal exógena, tales como el sistema tetraciclina, el sistema NFkappaB/luz UV, el sistema Cre/Lox y el promotor de los genes de choque térmico, los promotores regulables de la ARN polimerasa II descritos en WO/2006/135436 así como promotores específicos de tejido (por ejemplo, el promotor de PSA descrito en WO2006012221). En una forma de realización preferida, los promotores son promotores de la ARN polimerasa III que actúan de forma constitutiva. Los promotores de la ARN polimerasa III aparecen en un número limitado de genes tales como 5S ARN, ARNt, ARN 7SL y ARNsn U6. A diferencia de otros promotores de la ARN polimerasa III, los promotores de tipo III no requieren ninguna secuencia intragénica sino que necesitan de secuencias en dirección 5' que comprenden una caja TATA en posiciones -34 y -24, un elemento proximal de secuencia (*proximal sequence element* o PSE) entre -66 y -47 y, en algunos casos, un elemento distal (*distal sequence element* o DSE) entre las posiciones -265 y -149. En una forma de realización preferida, los promotores de ARN polimerasa III de tipo III son los promotores de los genes H1 y U6 de origen humano o murino. En una forma de realización aún más preferida, los promotores son 2 promotores U6 de origen humano o murino, un promotor U6 de ratón y un promotor H1 humano o un promotor U6 humano y un promotor H1 de ratón. En el contexto de la presente divulgación, promotores especialmente adecuados y por lo tanto, especialmente preferidos para expresar de forma específica genes de interés en tumores de mama, preferiblemente, en tumores de mama ER+, son los promotores del gen ER alpha o del gen Ciclina D1.

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

Vectores adecuados para la expresión de ARNip y ARNsh incluyen vectores de expresión en procariotas tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColEI, pCRII, RP4, fagos y vectores "shuttle" tales como pSA3 and pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y, en particular, lentivirus) así como vectores no virales tales como pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDTI. En una forma preferida de realización, los vectores son vectores lentivirales.

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

ARNip específicos para c-MAF incluyen el ARNip descrito en WO2005046731, una de cuyas cadenas es ACGGCUCGAGCAGCGACAA (SEQ ID NO: 6). Otras secuencias de ARNip específicas para c-MAF incluyen, sin limitación, CUUACCAGUGUGUUCACAA (SEQ ID NO: 7), UGGAAGACUACUACUGGAUG (SEQ ID NO: 8), AUUUGCAGUCAUGGAGAACC (SEQ ID NO: 9), CAAGGAGAAAUCGAGAAGU (SEQ ID NO: 10), ACAAGGAGAAAUCGAGAAG (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 invención. Las enzimas de ADN incorporan algunas de las características mecánicas tanto de las tecnologías de antisentido como de las de ribozimas. Las enzimas de ADN se diseñan de modo que reconozcan una secuencia diana de ácido nucleico particular, parecida al oligonucleótido antisentido, sin embargo las parecidas a la ribozima son catalíticas y cortan específicamente el ácido nucleico diana.

Ribozimas

También se pueden usar moléculas de ribozimas diseñadas para cortar de forma catalítica transcritos de un ARNm diana para prevenir la traducción de los ARNm que codifican c-MAF cuya actividad se desea inhibir. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar el corte específico de ARN. (Para una revisión, ver, Rossi,

Current Biology 4: 469-471, 1994). El mecanismo de acción De la ribozima implica hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima a un ARN diana complementario, seguido por un suceso de corte endonucleolítico. La composición de las moléculas de ribozima preferiblemente incluye una o más secuencias complementarias al ARNm diana, y la bien conocida secuencia responsable del corte del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente (ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5093246).

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

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

15 Anticuerpos inhibidores

Por "anticuerpo inhibidor" se entiende en el contexto de la presente divulgación todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse a la proteína c-MAF de manera específica e inhibir una o más de las funciones de dicha proteína, preferiblemente las relacionadas con la transcripción. Los anticuerpos pueden ser preparados usando cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la materia, algunos de los cuales ha sido citados anteriormente. Así, los anticuerpos policlonales se preparan mediante inmunización de un animal con la proteína que se desea inhibir. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Kohler, Milstein y col. (Nature, 1975, 256: 495). Anticuerpos adecuados en el contexto de la presente divulgación incluyen anticuerpos intactos que comprende una región variable de unión a antígeno y una región constante, fragmentos "Fab", "F(ab')₂" y "Fab", Fv, scFv, diabodies y anticuerpos biespecíficos. Una vez identificados anticuerpos con capacidad de unión a la proteína c-MAF, se seleccionarán aquellos capaces de inhibir la actividad de ésta proteína usando un ensayo de identificación de agentes inhibidores.

30 Péptidos inhibidores

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

35 *Dominantes negativos de c-MAF*

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

Alternativamente, dominantes negativos de c-MAF incluyen variantes de c-MAF que mantienen la capacidad de dimerización con otras proteínas pero que carecen de la capacidad de activar la transcripción. Estas variantes son, por ejemplo, aquellas que carecen del dominio de transactivación de c-MAF, localizado en el extremo N-terminal de la proteína. Así, variantes dominantes negativas de c-MAF incluyen, de forma ilustrativa, las variantes en las que se han eliminado al menos los aminoácidos 1 a 122 al menos los amino ácidos 1-187 o al menos los aminoácidos 1 a 257 (considerando la numeración de c-MAF humano tal y como se describe en US6274338).

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

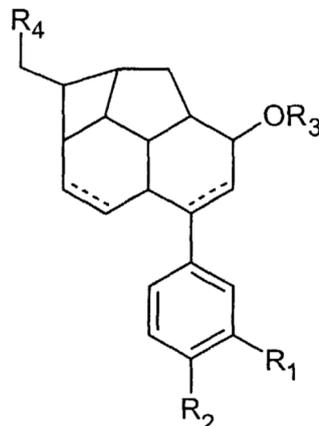
PGK. En una forma preferida de realización, el promotor que regula la transcripción del polinucleótido es el promotor de la RNA polimerasa del fago T7.

- 5 Preferiblemente, los promotores inducibles que pueden ser usados en el contexto de la presente divulgación son aquellos que responden a un agente inductor, que muestran una expresión basal nula o despreciable en ausencia de agente inductor y que son capaces de promover la activación del gen localizado en posición 3'. En función del tipo de agente inductor, los promotores inducibles se clasifican en promotores Tet on/off (Gossen, M. y H. Bujard (1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89:5547-5551; Gossen, M. et al., 1995, Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. y H.M. Blau, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456); promotores Pip on/off (US6287813); promotores dependientes de antiprogesterina (US2004132086), promotores dependientes de ecdisona (Christopherson et al., 1992, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89:6314-6318; No et al., 1996, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 93:3346-3351, Suhr et al., 1998, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 95:7999-8004 y WO9738117), un promotor dependiente de metalotioneína (WO8604920) y promotores dependientes de rapamicina (Rivera et al., 1996, Nat.Med. 2:1028-32).
- 10
- 15 Vectores adecuados para la expresión del polinucleótido que codifica la variante dominante negativa de c-MAF incluyen vectores derivados de vectores de expresión en procariotas tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColEI, pCRI, RP4, fagos y vectores "shuttle" tales como pSA3 and pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y, en particular, lentivirus) así como vectores no virales tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEFI/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAXI, pZeoSV2, pCI, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDTI.
- 20
- 25

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

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

30

I	<p>Derivados del ácido endiátrico H tales como los descritos en WO2004014888 y que corresponden a la fórmula general</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>donde</p> <p>R₁ y R₂ son, independientemente el uno del otro,</p> <p>1.0 H o</p> <p>2.0 un grupo -O-alquilo C₁-C₆, -O-alquenilo C₂-C₆, -O-alquinilo C₂-C₆ u -O-arilo C₆-C₁₀, en el cual alquilo, alquenilo y alquinilo son de cadena lineal o ramificados, y en el que los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo están mono- o disustituidos con:</p> <p>2.1 -OH,</p> <p>2.2 =O,</p> <p>2.3 -O-alquilo C₁-C₆, en el cual alquilo es de cadena lineal o ramificado,</p> <p>2.4 -O-alquenilo C₂-C₆, en el cual alquenilo es de cadena lineal o ramificado,</p> <p>2.5 -arilo C₆-C₁₀,</p> <p>2.6 -NH-alquilo C₁-C₆, en el cual alquilo es de cadena lineal o ramificado,</p> <p>2.7 -NH-alquenilo C₂-C₆, en el cual alquenilo es de cadena lineal o ramificado,</p> <p>2.8 -NH₂ o</p> <p>2.9 halógeno,</p> <p>y en el que el grupo arilo, eventualmente está mono- o disustituido con el sustituyente 2.1 ó 2.3 a 2.9,</p>
---	--

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

R₃ es

1.0 H o

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

2.1 -OH,

2.2 =O,

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

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

2.5 -arilo C₆-C₁₀,

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

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

2.8 -NH₂ o

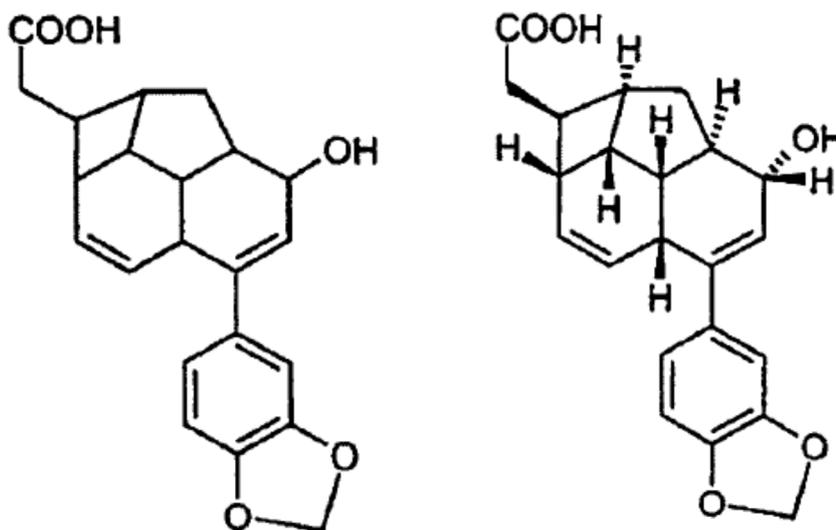
2.9 halógeno,

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

en el cual los sustituyentes 2.3, 2.4, 2.6 Y 2.7 pueden estar sustituidos adicionalmente con funciones -CN, -amida u -oxima, y 2.5 puede estar sustituido adicionalmente con funciones -CN o amida

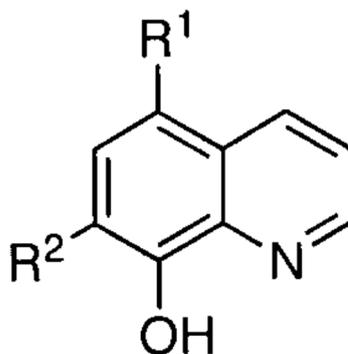
R₄ es CO₂R₃, CO₂NHR₃, CHO, CH₂OR₃, CH₂OSi(R₃)₃, CH₂Br, CH₂CN, en los cuales R₃ es tal como se ha definido arriba,

y, en particular, los compuestos



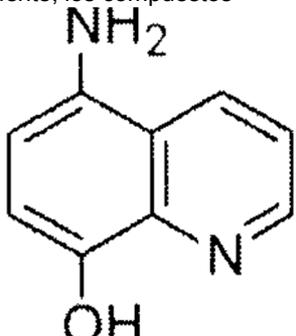
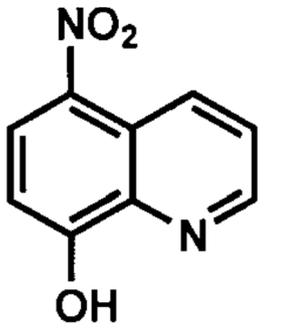
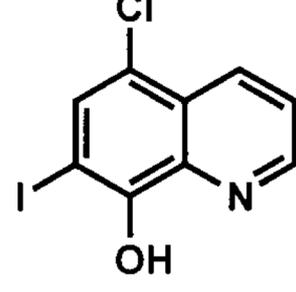
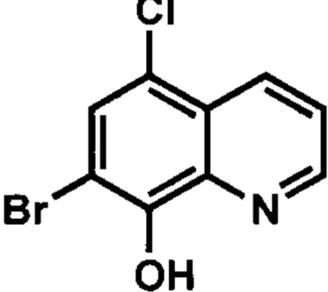
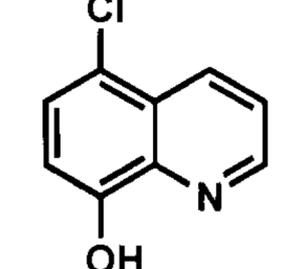
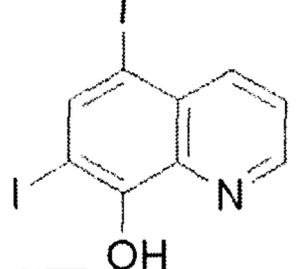
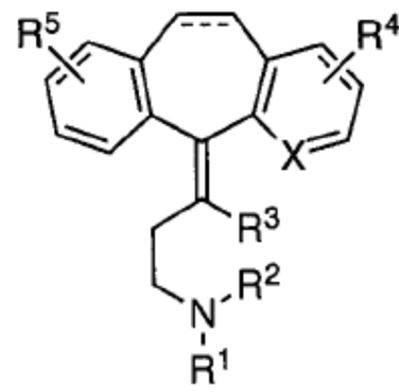
Derivados de 8-hidroxiquinolininas tales como los descritos en WO2009146546 de fórmula general

II



donde

R₁ se selecciona del grupo formado por NO₂, NH₂, NH(alquilo C₁-C₆) y N(alquilo C₁-C₆)(alquilo C₁-C₆);

	<p>R₂ se selecciona de H, halógeno, alquilo C₁-C₆, y alquilo C₁-C₆ sustituido con flúor, o</p> <p>R₁ es Cl y R₂ es Br oH, y, preferiblemente, los compuestos</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div>
<p>III</p>	<p>Clioquinol (5-cloro-7-yodoquinolin-8-ol) tal y como se describe en WO09049410</p> <p>Compuestos tales como los descritos en WO08098351 de fórmula general</p>
<p>IV</p>	<div style="text-align: center;">  </div> <p>Donde</p> <p>==-: es un enlace sencillo o doble,</p> <p>R¹ se selecciona del grupo formado por H, alquilo C₁-C₄, C(O)O alquilo C₁-C₄, C(O) alquilo C₁-C₄ y C(O)NH alquilo C₁-C₄;</p> <p>R² se selecciona entre H y alquilo C₁-C₄;</p> <p>R³ se selecciona de H y alquilo C₁-C₄;</p> <p>o R² y R³ están unidos y junto con el átomo de carbono y el átomo de nitrógeno a los que están unidos forman un anillo de piperidina,</p> <p>R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente entre H, halógeno, hidroxilo, alquilo C₁-C₄, alquilo C₁-C₄ sustituido por flúor y alcoxi C₁-C₄; y</p>

	X se selecciona entre C y N, y compuestos preferidos tales como Ciproheptadina (4-(5H-dibenzo[a,d]cicloheptan-5-ilideno)-1-metilpiperidina), Amitriptilina (3-(10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]cicloheptene-5-ilideno)-N,N-dimetil-1-propanamina), Loratadina (etil-4-(8-cloro-5,6-dihidro-11H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridin-11-ilidino)-1-piperidincarboxilato), Ciclobenzapina (3-(5H-dibenzo[a,d]cicloheptan-5-ilideno)-N,N-dimetil-1-propanamina).
v	Nivalenol (12,13-epoxi-3,4,7,15-tetrahidroxitrichotec-9-en-8-ona) tal y como se describe en WO0359249

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

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

Antagonista	Referencia para la actividad inhibidora cdk2
Análogos de Purina	
Purvalanoles tales como 2-(1R-isopropil-2-hidroxietilamino)-6-(3-cloroanilino)-9-isopropilpurina que tiene una fórmula molecular $C_{19}H_{25}ClN_6O$ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca Purvalanol A (#P4484, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), Pulvalanol B, aminopurvalanol, compuesto 52 (en donde el isopropilo de purvalanol A se reemplaza con H)	Gray, N.S. <i>et al.</i> , Science, 281, 533-538 (1998); Chang, Y.T. <i>et al.</i> , Chem. Biol. 6, 361-375 (1999).
2-(hidroxietilamino)-6-bencilamino-9-metilpurina que tiene una fórmula molecular $C_{15}H_{18}N_6O$ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca Olomoucine (#O0886), 2-(2'-Hidroxietilamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina que tiene una fórmula molecular $C_{17}H_{22}N_6O$ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca N ⁹ -isopropylolomoucine (#I0763); CVT-313	Vesely, J., <i>et al.</i> (1994) Eur. J. Biochem, 224, 771-86, 11; Brooks, E. E., <i>et al.</i> (1997) J. Biol. Chem., 272, 29207-11
6-(Bencilamino)-2(R)-[[1-(hidroximetil)propil]amino]-9-isopropilpurina 2-(R)-[[9-(1-metiletil)-6-[[fenilmetil]amino]-9H-purin-2-il]amino]-1-butanol que tiene una fórmula molecular de $C_{19}H_{26}N_6O$ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca Roscovitine (#R7772), metoxiroscovitina	Wang, D. <i>et al.</i> , J. Virol., 75, 7266-7279 (2001); McClue, S.J. <i>et al.</i> , Int. J. Cancer, 102, 463-468 (2002); Meijer, L., <i>et al.</i> , (1997) Eur. J. Biochem., 243, 527-36
Análogo de purina N2-(cis-2-aminociclohexil)-N6-(3-clorofenil)-9-etil-9H-purin-2,6-diamina que tiene una fórmula molecular de $C_{19}H_{24}ClN_7$ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca CGP74514 (#C3353)	Imbach, P. <i>et al.</i> , Bioorg. Med. Chem., Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K., <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).

CGP79807, un análogo de purina de CGP74514 (supra) en donde Cl se reemplaza con CN, OH se remueve, y la posición orto del anillo ciclohexano es NH ₂	Imbach, P. <i>et al.</i> , <i>Bioorg. Med. Chem. Lett</i> , 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> 44, 524-530 (2001).
Análogo de purina tal como O6-ciclohexilmetil guanina NU2058	Arris, C.E. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 43, 2797-2804 (2000); Davies <i>et al.</i> , <i>Nature Structural Biology</i> , 9:10, 745-749, 2002
Análogo de Purina tal como NU6102	Arris, C.E. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 43, 2797-2804 (2000); Davies, T.G. <i>et al.</i> , <i>Nat. Struct. Biol.</i> , 9, 745-749 (2002).
Isopentenil-adenina	Vesely, J., <i>et al.</i> , (1994) <i>Eur. J. Biochem.</i> , 224, 771-86
Agentes sin base en Purina	
Indirubinas tales como indirubin-3'-monoxima que tiene una fórmula molecular de C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₂ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca (#10404), 5-sulfonato de indirubina, 5-cloro indirubina	Davies, T.G. <i>et al.</i> , <i>Structure</i> , 9, 389-397 (2001); Marko, D. <i>et al.</i> , <i>Br. J. Cancer</i> , 84, 283-289 (2001); Hoessel, R., <i>et al.</i> , (1999) <i>Nat Cell Biol.</i> , 1, 60-7; PCT/US02/30059 a Hellberg <i>et al.</i> , publicada como WO 03/027275.
Oxindol 1 de Fischer como referencia en la columna 2 de esta tabla (#IN118, JMAR Chemical,	Poros-Makkay, M., <i>et al.</i> , <i>Tetrahedron</i> 2000, 56, 5893; <i>Org. Process Res. Dev.</i> 2000, 4, 10
Indenopirazoles	Nugiel, D.A. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> 44, 1334-1336 (2001); Nugiel, D.A. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 45, 5224-5232 (2002); Yue, E.W. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> 45, 5233-5248 (2002)
Pirido(2,3-d)pirimidin-7-onas, compuesto 3 de Fischer	Barvian, M. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 43, 4606-4616 (2000); Toogood, P.L., <i>Med. Res. Rev.</i> , 21, 487-498 (2001)
Quinazolininas tales como anilinoquinazolina	Sielecki, T.M. <i>et al.</i> , <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 11, 1157-1160 (2001); Mettey <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> 2003, 46, 222-236.
Tiazoles tales como tiazol combinado 4-[[[7-oxo-6,7-dihidro-8H-[1,3]tiazol[5,4-e]indol-8-iliden)metil]amino]-N-(2-piridil)bencensulfonamida que tiene una fórmula molecular de C ₂₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S ₂ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca GW8510 (#G7791)	Davis, S.T. <i>et al.</i> , <i>Science</i> , 291, 134-137 (2001); PCT/US02/30059 para Hellberg <i>et al.</i> , publicada como WO 03/027275.
Flavopiridoles tales como flavopiridol (L86 8275; NCS 649890, National Cancer Institute, Bethesda, MD) y un derivado de decloro	Carlson, B.A., <i>et al.</i> , (1996) <i>Cancer Res.</i> , 56, 2973-8.
Alcaloides tales como Estaurosporina (#S1016, A.G. Scientific, San Diego, CA) o UCN-01 (7-hidroxiestaurosporina) National Cancer Institute, Bethesda, MD	Rialet, V., <i>et al.</i> , (1991) <i>Anticancer Res.</i> , 11, 1581-90; Wang, Q., <i>et al.</i> , (1995) <i>Cell Growth Differ.</i> , 6, 927-36, Akiyama, T., <i>et al.</i> , (1997) <i>Cancer Res.</i> , 57, 1495-501, Kawakami, K., <i>et al.</i> , (1996) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 219, 778-83
Paulonas tales como 9-Bromo-7,12-dihidro-indol[3,2-d][1]benzacepin-6(5H)-ona que tiene una fórmula molecular de C ₁₆ H ₁₁ BrN ₂ O disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca kenpaulone (#K3888) o 9-Nitro-7,12-dihidroindol-[3,2-d][1]benzacepin-6(5)ona que tiene una fórmula molecular de C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₃ disponible de Sigma-Aldrich bajo la marca alsterpaulone (#A4847)	Zaharevitz, D.W. <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , 59, 2566-2569 (1999); Schultz, C., <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 42, 2909-2919 (1999); Zaharevitz, D.W., <i>et al.</i> , (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59, 2566-9; PCT/US02/30059 para Hellberg <i>et al.</i> , publicada como WO 03/027275.
CGP 41251, un alcaloide	Begemann, M., <i>et al.</i> , (1998) <i>Anticancer Res.</i>

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

Tabla 2: inhibidores de c-MAF

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

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

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

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

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

intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000). Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

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

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

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

TRATAMIENTO O PREVENCIÓN DE LA DEGRADACIÓN ÓSEA EN PACIENTES DE CÁNCER DE MAMA CON METÁSTASIS EN HUESO QUE PRESENTAN NIVELES ELEVADOS DE C-MAF

Los autores de la presente invención han demostrado que los niveles de c-MAF se encuentran elevados en las metástasis en hueso de tumores mama. Asimismo, los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que el medio condicionado de líneas celulares derivadas de tumores de mama primarios y que presentar alta capacidad de dar lugar a metástasis en hueso y que sobre-expresan c-MAF son capaces de inducir la formación osteoclastos en mayor grado que las células que no sobre-expresan c-MAF. Así, aquellos pacientes que sufren cáncer de mama que ya ha metastatizado en hueso y en los que aparecen niveles elevados de c-MAF en dichas metástasis pueden beneficiarse particularmente de terapias encaminadas de evitar la degradación ósea causada por la actividad osteoclástica aumentada.

Así, se describe el uso de un agente para evitar o prevenir la degradación ósea en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la metástasis en hueso en un sujeto que padece cáncer de mama y presenta los niveles de c-MAF elevados en una muestra de tejido tumoral metastásico con respecto a una muestra control.

Alternativamente, la divulgación se relaciona con un agente para evitar o prevenir la degradación ósea para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la metástasis en hueso en un sujeto que padece cáncer de mama y presenta los niveles de c-MAF elevados en una muestra de tejido tumoral metastásico con respecto a una muestra control.

5 Alternativamente, la divulgación se relaciona con un método de prevención y/o tratamiento de la degradación en un sujeto que padece cáncer de mama y presenta los niveles de c-MAF elevados en una muestra de tejido tumoral metastásico con respecto a una muestra control, que comprende la administración de un agente para evitar o prevenir la degradación ósea a dicho sujeto.

10 En una realización particular, la metástasis en hueso es metástasis osteolítica. En otra realización particular, el cáncer de mama es cáncer de mama ER+ o ER-.

15 Los términos y expresiones “sujeto”, “cáncer de mama ER+”, “muestra de tejido tumoral”, “metástasis”, “gen c-MAF”, “niveles de expresión incrementados o elevados” y “muestra control” han sido descritos en detalle en relación con el primer método y son igualmente aplicables al agente para evitar o prevenir la degradación ósea.

Agentes capaces de evitar o prevenir la degradación ósea adecuados para el método terapéutico descrito anteriormente se han descrito en detalle con anterioridad en el contexto del método de terapias personalizadas.

20 La muestra de referencia o control es una muestra de tejido tumoral de un sujeto con cáncer de mama ER+ o ER- que no ha sufrido metástasis o que corresponden al valor mediana de los niveles de expresión del gen c-MAF medidos en una colección de tejidos tumorales en muestras de biopsias de sujetos con cáncer de mama ER+ que no han sufrido metástasis.

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

30 Alternativamente se puede llevar a cabo un tratamiento combinado, en el que se combinen más de un agente para evitar o prevenir la degradación ósea de los mencionados anteriormente para tratar y/o prevenir la metástasis o bien se pueden combinar dichos agentes con otros suplementos, tal como calcio o vitamina D o con alguna hormona.

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

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no pretenden ser limitativos del alcance de la misma.

40 Ejemplos

i. Materiales y métodos

Modelos experimentales de estudio

45 Se han desarrollado nuevos modelos experimentales para el estudio de la metástasis en cáncer de mama ER+. Con este fin se ha utilizado una línea celular humana de cáncer de mama ER+, denominada MCF7, la cual se transfectó de forma estable con un vector que permite la expresión de la GFP/Luciferasa. Esta línea celular se inoculó en ratones inmunodeficientes (Balb-c/nude) por inyección vía intraventricular o en la vena caudal para poder seleccionar células con capacidad metastásica en distintos órganos. Los ratones llevaron implantes subcutáneos de estrógenos que garantizaron la presencia de esta hormona durante todo el experimento.

Selección de poblaciones metastásicas

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

Una vez identificadas y aisladas las poblaciones metastásicas se realizó un análisis transcripcional de alto rendimiento. En conjunto, esta estrategia permitió identificar genes cuya transcripción se ve incrementada y algunos, que actúan como mediadores del proceso metastásico en células cancerosas con mala prognosis. La implicación de los genes cuya expresión se encuentra alterada en la colonización por parte de las células metastásicas en tejidos y órganos concretos fue confirmada mediante un procedimiento de selección *in vivo* no sesgado.

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

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

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

A continuación el grupo de genes seleccionado como candidatos a regular la capacidad de metástasis a hueso en cáncer de mama ER+ se sometió a validación clínica en humanos. Para ello, se compararon los cambios de expresión de los genes candidatos con aquellos que ocurren en los perfiles de expresión génica de dos cohortes, una de tumores primarios de mama y la otra de metástasis, que incluyen 560 y 58 tumores de mama y metástasis respectivamente.

Identificación de aquellos genes enriquecidos en metástasis a hueso en cáncer de mama ER+ que son relevantes en metástasis a hueso en cáncer de mama ER-

Se procedió a evaluar el papel de los genes enriquecidos en metástasis a hueso en cáncer de mama ER+ en el subtipo ER-. El grupo de genes enriquecido para metástasis a hueso en cáncer de mama ER+ incluye el factor de transcripción c-MAF.

Bioinformática y biología computacional

Para obtener los grupos de genes enriquecidos en metástasis y verificar su correlación clínica se usaron paquetes estadísticos R y Bioconductor. Las funciones y estructuras específicas para el tratamiento de los datos fueron importadas y son de acceso público abierto a través de www.bioconductor.org.

Ejemplo 1

Selección de genes relevantes

Se llevó a cabo un análisis para seleccionar genes que se expresan de forma diferencial en células derivadas de una línea celular de cáncer de mama ER+ con propensión a formar metástasis a hueso (Figura 1A). El análisis realizado permitió identificar 91 genes enriquecidos o silenciados en las líneas celulares derivadas de la línea celular ER+ MCF7 con capacidad de metastatizar a hueso (Figura 1B). Los genes y funciones determinantes de forma individual fueron seleccionados para un estudio más detallado siguiendo los siguientes criterios:

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

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

Ejemplo 2

Valor terapéutico y valor pronóstico de los genes enriquecidos para metástasis a hueso independiente del subtipo de cáncer de mama:

Los genes enriquecidos en las metástasis a hueso mediante el sistema experimental de selección de poblaciones celulares metastásicas aquí desarrollado se evaluaron frente a dos bases de datos distintas que contenían los perfiles de expresión y las anotaciones clínicas de 560 tumores primarios de cáncer de mama y 58 metástasis de pacientes con cáncer de mama. Estos tumores son representativos de todos los subtipos de cáncer de mama y localización de metástasis. Ambas bases de datos y sus anotaciones clínicas son accesibles públicamente (GSE 2603, 2034, 12276 y 14020).

La expresión génica en tumores primarios ER+ de los genes de metástasis a hueso correlacionó de manera significativa con recurrencia, supervivencia libre de metástasis y supervivencia (Figuras 1C y D).

Por otro lado, se evaluaron los niveles de expresión del gen c-MAF en una cohorte de 58 metástasis de pacientes con cáncer de mama (GSE 14020). Estas metástasis fueron aisladas de pulmón, hígado, hueso y cerebro. Se verificó el enriquecimiento del gen c-MAF específicamente en metástasis a hueso con independencia del subtipo de cáncer de mama, ER+ o ER-, al que perteneciera el tumor o lesión metastásica (Figura 2A).

Ejemplo 3

Validación funcional in vivo del gen metastásico c-MAF a hueso en cáncer de mama ER-

El gen metastásico c-MAF, que resultó positivo en el análisis, fue validado funcionalmente en un ensayo de colonización metastásica a hueso en un modelo experimental de injerto de metástasis de cáncer de mama en ratones. La selección de células de cáncer de mama ER- con alta capacidad de crecer en hueso va acompañada de la selección de altos niveles del gen metastásico c-MAF (Figura 2B).

Las aproximaciones realizadas para validar el gen candidato a dirigir el proceso de metástasis fueron ensayos de ganancia de función. Con este fin, el gen c-MAF fue expresado en las células parentales MDA-MB-231 y posteriormente se evaluó su capacidad para inducir la expresión de genes que contribuyen a la metástasis (CTGF) (Figura 2C).

Ejemplo 4

Validación funcional in vivo de los genes metastásicos específicos de tejido

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

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

Ensayos de ganancia de función

Para expresar el gen c-MAF se utilizaron sistemas lentivirales para inducir la expresión heteróloga del gen candidato en las células tumorales parentales y aquellas seleccionadas con baja capacidad metastásica. La capacidad inductora de metástasis del gen c-MAF fue determinada mediante técnicas de seguimiento por bioluminiscencia de las células metastásicas inoculadas en el ratón por vía intracardiaca (como se describe en el apartado "modelos experimentales de estudio"). En todos los casos, se inyectaron en paralelo las correspondientes células control infectadas con vectores lentivirales que no expresaban la proteína c-MAF en una cohorte paralela de animales como control negativo (Figura 3B).

Ensayos de pérdida de función

La expresión del gen c-MAF fue suprimida en la línea celular BoM2 altamente metastásica a hueso y que presenta elevados niveles de expresión del gen c-MAF endógeno (Figura 3A y 3C). Con este fin se utilizó un vector lentiviral que permitía la expresión de un ARN de interferencia (ARNip) con capacidad para reducir la expresión del gen c-MAF en un 80% en relación a los niveles presentes en la línea celular BoM2. Esta población celular con la expresión del gen c-MAF silenciada fue inoculada por vía intracardiaca (como se describe en el apartado "modelos experimentales de estudio") en ratones inmunodeprimidos siendo estos animales monitorizados para detectar actividad metastásica mediante técnicas de imagen por bioluminiscencia. En estos experimentos se usó como control negativo células obtenidas a partir de la línea BoM2 por infección con un vector lentiviral que codifica para un ARNip que actúa eficazmente contra la expresión de otro gen que es irrelevante para el proceso metastásico.

Ejemplo 5

Ensayo de diferenciación de osteoclastos

5 Se aislaron células primarias procedentes de la médula ósea de un ratón y se hicieron crecer en cultivo en presencia de M-CSF (factor estimulador de colonias - macrófagos). Después de 3 días las células fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 24 pocillos (1.5x10⁴ células por pocillo), en triplicado para cada condición experimental. Para inducir la diferenciación de osteoclastos, estos precursores fueron cultivados con medio condicionado procedente de células de cáncer de mama ER+ MCF7 con o sin sobreexpresión de las isoformas “short” y “long” del gen c-MAF, en presencia de ligando RANK y M-CSF. El medio fue renovado cada tres días y, en el séptimo día, se procedió a la tinción específica de osteoclastos, que consiste en detectar la enzima fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP, por sus siglas en inglés). Se obtuvieron imágenes mediante microscopio óptico de haz invertido. Se determinó el número de células TRAP positivas y se dividió entre el número total de células por campo. Finalmente, todos los valores fueron normalizados con los del grupo control, MCF7. Tal como se puede observar en la Figura 4, el número de osteoclastos aumentó cuando se pusieron en contacto precursores de osteoclastos con medio procedente de células de cáncer de mama ER+ MCF7 que sobre-expresan la isoforma corta de c-MAF o la isoforma larga.

20 Este ensayo permite determinar la interacción de las células metastásicas con los componentes del entorno metastásico o nicho del hueso. Los osteoclastos son responsables de la degradación del hueso y se manifiestan en las lesiones metastásicas osteolíticas.

Ejemplo 6

25 Identificación de ampliación cromosómica en la región chr16q22-q24 (incluye gen c-MAF)

La detección de alteraciones en el número de copias (del inglés, CNA) mediante análisis de perfiles de expresión es teóricamente posible ya que existe una fuerte correlación entre las alteraciones genómicas y la expresión aberrante de genes en las regiones genómicas afectadas (Pollack *et al.* 2002; PNAS; 99:12963–12968). En concreto, la detección exacta de CNAs utilizando análisis de expresión génica es posible y su dificultad proviene del tipo de datos de expresión de partida (Hu *et al.* 2009 Cancer Cell, 15:9-20).

35 Se ha procedido a evaluar el papel de los genes enriquecidos en metástasis a hueso en cáncer de mama ER+. Para ello se analizaron las alteraciones en el número de copias del genoma en las células altamente metastásicas a hueso, BoM2, derivadas de la línea celular de cáncer de mama MCF7 que generadas en el propio laboratorio de los investigadores y que se caracterizan por la expresión de altos niveles de gen c-MAF. Este análisis se ha basado en la comparación de los perfiles de expresión génica de las células parentales y BoM2 derivadas de MCF7. Se alinearon y se localizaron las diferencias de expresión génica observadas en las células BoM2 en comparación con las células parentales en su posición, en los 23 tipos de cromosomas presentes en células humanas.

40 De esta manera, se han identificado regiones genómicas (Figura 5) la expresión de cuyos genes está sobre o infra representada en las células BoM2 en comparación con las células parentales, lo cual es un indicador de amplificación o delección de ADN genómico (Hu *et al.* 2009 Cancer Cell, 15:9-20). Para ello, se ha utilizado el software “Partek Genomic Suite 6.5”. Este software nos ha permitido identificar aquellos genes cuya expresión está incrementada o reducida en las células BoM2 en comparación con las parentales. Una vez identificados estos genes, las diferencias de expresión observadas para cada gen se representaron en la correspondiente localización cromosómica de dicho gen. La representación gráfica de estas observaciones ha permitido identificar ganancias o pérdidas de regiones cromosómicas basándose en una continua expresión incrementada o reducida de genes con una localización cromosómica consecutiva (Figura 5). Los autores de la invención han sido capaces de posicionar estas regiones utilizando citobandas bien conocidas y descritas con anterioridad.

50 Entre las regiones diferencialmente amplificadas en las células BoM2, en comparación con las células parentales MCF7 ER+ de cáncer de mama, se ha observado una ganancia en la región cromosómica 16q22-q24, la cual incluye el locus que codifica el gen c-MAF.

55 De esta manera, se han identificado regiones cromosómicas con un número significativo de genes asociados con metástasis, identificados usando el modelo “Cox log Hazard ratio (HR). Se han seguido los conceptos en ACE (Análisis de alteraciones en el número de copias en datos de expresión) (Hu *et al.* 2009, citado *ad supra*), localizando regiones potenciales con variaciones en el número de copias. Se han utilizado funciones del paquete R “phenoTest”. Así, se han obtenido el “log HR” para cada gen vía la generalización de modelos aditivos, eligiendo parámetros vía validación cruzada y se ha evaluado la significancia estadística permutando (1000 permutaciones) el “log HR” por todo el genoma, y ajustando los P-valores vía Benjamini-Hochberg para controlar el índice de falsos positivos (FDR) a un nivel de 0.05. Únicamente las regiones con un mínimo de 15 genes significativos y consecutivos han sido identificadas (Figura 5B). La región 16q12-q24 que incluye al gen c-MAF se encuentra entre esas regiones.

65 El número de copias del gen c-MAF se caracterizó subsecuentemente mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) in células parentales MCF7 y en la línea celular BoM2, caracterizada por tener alta propensión para producir metástasis en tejido óseo. El número de copias de IGH se determinó simultáneamente como control del

5 experimento. Los resultados mostraron que la mayoría de las células MCF7 estudiadas tienen una tasa entre el número de copias del gen c-MAF y el número de copias del gen IGF igual a o menor que 1,5, por ejemplo, que el número de copias de ambos genes es similar (Figura 6), mientras que la mayoría de las células BoM2 estudiadas mostraron una tasa entre el número de copias del gen c-MAF y el número de copias del gen IGF mayor que 2 (Figura 6). Estos resultados demuestran que la adquisición del fenotipo metastásico óseo a partir de las células de cáncer de mama va acompañada de un incremento en el número de copias del gen c-MAF.

Conclusiones

10 c-MAF es un marcador para diagnóstico y pronóstico y un gen diana causal en procesos de metástasis en cáncer de mama, en particular, en metástasis a hueso de cáncer de mama ER+. Esta conclusión se apoya por los datos de validación clínica y los experimentos de ganancia y pérdida de función que forman parte de la presente divulgación.

15 Teniendo en cuenta los resultados presentados en la presente divulgación, en donde se demuestra que la expresión de c-MAF en tumores primarios predice un alto riesgo de sufrir metástasis a hueso en pacientes con cáncer de mama, los pacientes cuyos tumores contengan células que presenten una amplificación en la región genómica chr16q22-q24 o una amplificación del gen c-MAF, también serán susceptibles de sufrir un alto riesgo de metástasis a hueso. Por tanto, la determinación de la amplificación del gen c-MAF o del locus 16q22-q24 es útil como método de diagnóstico y método de predicción de metástasis a hueso a partir de tumores primarios de cáncer de mama.

20 Asimismo, los experimentos de la presente divulgación (Ejemplos 4 y 5) sugieren que c-MAF es una diana adecuada para el tratamiento y/o prevención de la metástasis (tanto a partir de tumores ER+ como ER-). Así inhibidores de c-MAF serían útiles para el tratamiento de la metástasis en sujetos con cáncer de mama.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Fundació Privada Institut de Recerca Biomèdica
Fundació Privada Institució Catalana De Recerca I Estudis
Avançats

<120> MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA
METÁSTASIS DE CÁNCER DE MAMA

<130> P6136EPPC01

<150> P2010314788
<151> 2010-10-06

<150> P201131073
<151> 2011-06-27

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 6878
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 1
agaggcttta aaatcttttt tcatcttcta gctgtagctc gggctgcttg tcggcttggc 60
ctccccctcc cccttttgct ctctgcctcg tctttcccca ggacttcgct attttgcttt 120
tttaaaaaaa ggcaagaaag aactaaactc ccccctccct ctctccagc cgggctgcac 180
ctctgccttg cactttgcac agaggtagag agcgcgcgag ggagagagag gaaagaaaa 240
aaataataaa gagagccaag cagaagagga ggcgagaagc atgaagtgtt aactcccccg 300
tgccaaggcc cgcgccgcc ggacagacgc ccgccgcgcc tccagccccg agcggacgcc 360
gcgcgcgccc tgcctgcagc ccgggcccgc gaggcgagcc ctctcttatg caaagcgcgc 420
agcggagcgg cgagcggggg acgccgcgca ccgggcccgg ctctccagc ttcgccgccg 480
cagccaccac cgccgccacc gcagctcgcg gaggatcttc ccgagcctga agccgccggc 540
tcggcgcgca aggaggcgag cgagcaagga ggggcccggg cgagcgaggg agcacattgg 600
cgtgagcagg ggggaggag ggcgggcccg gggggcgcgg gcagggcggg ggggtgtgtg 660
tgtgagcgcg ctcgagggtt tcgggccagc caccgccgcg caagctagaa gcgccccagc 720
ccggcaagct ggctcaccgc ctggccacc agcacagccc gctggcccct ctctgcagc 780
ccatctggcg gagcggcggc ggcggcggcg gcggcggcag gagaatggca tcagaactgg 840
caatgagcaa ctccgacctg cccaccagtc ccctggccat ggaatatgtt aatgacttgc 900
atctgatgaa gtttgaagtg aaaaaggaac cgggtggagac cgaccgcac atcagccagt 960
gcggccgtct catcgccggg ggctcgtgt cctccacccc catgagcacg ccgtgcagct 1020
cggtgcccc ttccccagc ttctcggcgc ccagcccggg ctcgggcagc gagcagaagg 1080

ES 2 721 639 T3

cgcacctgga agactactac tggatgaccg gctaccgcga gcagctgaac cccgaggcgc 1140
 tgggcttcag ccccgaggac gcggtcgagg cgctcatcag caacagccac cagctccagg 1200
 gcggcttcga tggctacgcg cgcggggcgc agcagctggc cgcggcgccg ggggcccgtg 1260
 ccggcgccctc cttggggcgc agcggcgagg agatgggccc cgcggccgcc gtggtgtccg 1320
 ccgtgatcgc cgcggccgcc gcgcagagcg gcgcgggccc gcactaccac caccaccacc 1380
 accacgccgc cggccaccac caccaccoga cggccggcgc gcccggccgc gcgggcagcg 1440
 cggccgcctc ggccggtggc gctggggggc cgggcggcgg tggcccggcc agcgtgggg 1500
 gcggcgcccg cggcgccgcc ggcggaggcg gcgggggcgc ggcggggcg gggggcgccc 1560
 tgcacctgca ccacgccgc ggcggcctgc acttcgacga ccgcttctcc gacgagcagc 1620
 tggtgaccat gtctgtgcgc gagctgaacc ggcagctgcg cggggtcagc aaggaggagg 1680
 tgatccggct gaagcagaag aggcggaccc tgaaaaaccg cggctatgcc cagtccctgc 1740
 gcttcaagag ggtgcagcag agacacgtcc tggagtcgga gaagaaccag ctgctgcagc 1800
 aagtcgacca cctcaagcag gagatctcca ggctggtgcg cgagagggac gcgtacaag 1860
 agaaatacga gaagttggtg agcagcggct tccgagaaaa cggctcgagc agcgacaacc 1920
 cgtcctctcc cgagtttttc atgtgagtct gacacgcgat tccagctagc caccctgata 1980
 agtgctccgc gggggtccgg ctcggtgtg ggcttgctag ttctagagcc atgctcgcca 2040
 ccacctcacc acccccaccc ccaccgagtt tggccccctt ggccccctac acacacacaa 2100
 acccgcacgc acacaccaca cacacacaca cacacacaca cacaccac accctgctcg 2160
 agtttgggt ggtggtggct gtttaaaact ggggagggaa tgggtgtctg gctcatggat 2220
 tgccaatctg aaattctcca taacttgcta gcttgttttt ttttttttt tacaccccc 2280
 cgccccacc ccggacttgc acaatgttca atgatctcag cagagttctt catgtgaaac 2340
 gttgatcacc tttgaagcct gcatcattca catatTTTTT cttcttcttc cccttcagtt 2400
 catgaactgg tgttcatttt ctgtgtgtgt gtgtgtttta tttgttttg atttttttt 2460
 ttaattttac ttttagagct tgctgtggtg cccacctttt ttccaacctc caccctcact 2520
 cttctcaac ccatctcttc cgagatgaaa gaaaaaaaa agcaaagttt tttttcttc 2580
 tcctgagttc ttcattgtgag attgagcttg caaaggaaaa aaaaatgtga aatgttatag 2640
 acttgacgcg tgccgagttc catcggggtt ttttttagc attgttatgc taaaatagag 2700
 aaaaaatcc tcatgaacct tccacaatca agcctgcac aaccttctgg gtgtgacttg 2760
 tgagttttg ccttgatgat ccaaactgga gagtttagtc tgccattaaa aaaactcatt 2820
 ctcatctcat gcattattat gcttgctact ttgtcttagc aacaatgaac tataactggt 2880
 tcaaagactt tatggaaaag agacattata ttaataaaaa aaaaaagcct gcatgctgga 2940
 catgtatggt ataattatTT tttccttttt tttcctttt ggcttggaaa tggacgttctg 3000

ES 2 721 639 T3

aagacttata gcatggcatt catacttttg ttttattgcc tcatgacttt tttgagtta 3060
gaacaaaaca gtgcaaccgt agagccttct tcccatgaaa ttttgcactct gctccaaaac 3120
tgctttgagt tactcagaac ttcaacctcc caatgcactg aaggcattcc ttgtcaaaga 3180
taccagaatg ggttacacat ttaacctggc aaacattgaa gaactcttaa tgttttcttt 3240
ttaataagaa tgacgcccc a tttgggggac taaaattgtg ctattgccga gaagcagtct 3300
aaaatttatt ttttaaaaag agaaactgcc ccattatfff tggtttgttt tatttttatt 3360
ttatattttt tggcttttg t cattgtcaa atgtggaatg ctctgggttt ctagtatata 3420
atttaattct agtttttata atctgttagc ccagttaaaa tgtatgctac agataaagga 3480
atgttataga taaatttgaa agagttagg tctgttagct gtagatfff taaacgattg 3540
atgcactaaa ttgtttacta ttgtgatgtt aaggggggta gagtttgcaa ggggactgtt 3600
taaaaaagt agcttataca gcatgtgctt gcaacttaa tataagttgg gtatgtgtag 3660
tctttgctat accactgact gtattgaaaa ccaaagtatt aagaggggaa acgccctgt 3720
ttatatctgt aggggtattt tacattcaaa aatgtatgtt ttttttctt ttcaaaatta 3780
aagtatttg gactgaattg cactaagata taacctgcaa gcatataata caaaaaaaaa 3840
ttgcaaaact gtttagaacg ctaataaaat ttatgcagtt ataaaaatgg cattactgca 3900
cagttttaag atgatgcaga tttttttaca gttgtattgt ggtgcagaac tggattttct 3960
gtaacttaa aaaaaatcca cagtttttaa ggcaataatc agtaaagtgt attttcaggg 4020
actgacatcc tgtcttttaa aagaaatgaa aagtaaactt taccacaata aatataaaaa 4080
aatcttgtca gttacttttc ttttacatat tttgctgtgc aaaattgttt tataatctga 4140
gttactaact aaccacgctg gttgttccta tgtgcttttc tttcattttc aattctggtt 4200
atatcaagaa agaataatc tacaataata aacggcattt ttttttgatt ctgtactcag 4260
tttcttagtg tacagtttaa ctggggccca caacctcgtt aaaagtgtaa aatgcatcct 4320
tttctccagt ggaaggattc ctggaggaat agggagacag taattcaggg tgaattata 4380
ggctgttttt tgaagtgagg aggctggccc catatactga ttagcaatat ttaatataga 4440
tgtaaattat gacctcattt ttttctcccc aaagttttca gttttcaaat gagttgagcc 4500
ataattgccc ttggtaggaa aaacaaaaca aaacagtgga actaggcttc ctgagcatgg 4560
ccctacactt ctgatcagga gcaaagccat ccatagacag aggagccgga caaatatggc 4620
gcatcagagg tggcttgccg acatatgcat tgaacggtaa agagaaacag cgcttgccct 4680
ttcactaaag ttgactatft ttccttcttc tcttacacac cgagatfttc ttgtagcaa 4740
ggcctgacaa gatttaacat aaacatgaca aatcatagtt gtttgttttg ttttgctttt 4800
ctctttaaca ctgaagatca tttgtcttaa ataggaaaa gaaaatccac tccttacttc 4860

ES 2 721 639 T3

catatttcca agtacatatc tggtttaaac tatgttatca aatcatatth caccgtgaat 4920
 attcagtggga gaacttctct acctggatga gctagtaatg atttcagatc atgctatccc 4980
 cagaaataaa agcaaaaaat aatacctgtg tggaatatag gctgtgcttt gatttactgg 5040
 tatttaccoc aaaataggct gtgtatgggg gctgacttaa agatcccttg gaaagactca 5100
 aaactacctt cactagtagg actcctaagc gctgacctat ttttaaatga cacaaattca 5160
 tgaaactaat gttacaaatt catgcagttt gcactcttag tcatcttccc ctagcacacc 5220
 aatagaatgt tagacaaaagc cagcactggt ttgaaaatac agccaaacac gatgactttt 5280
 gttttgtttt ctgccgttct taaaagaaaa aaagataata ttgcaactct gactgaaaga 5340
 cttatthtta agaaaacagg ttgtgtttgg tgctgctaag ttctggccag tttatcatct 5400
 ggcttccctg cctatthttt acaaaacacg aagacagtgt gtaacctcga cattttgacc 5460
 ttcctttatg tgctagtthta gacaggctcc tgaatccaca cttatthttg cttaacaaaa 5520
 gtcttaatag taaacctccc ctcatgagct tgaagtcaag tgttcttgac ttcagatatt 5580
 tctttccttt tttttthttt ttctcatca caactaagag atacacaaac tctgaagaag 5640
 cagaaatgga gagaatgctt ttaacaaaaa agcatctgat gaaagattht aggcaaacat 5700
 tctcaaaata agagtgatat tctggatgta gttattgcag ttatctcatg acaaatgagg 5760
 cctggattgg aaggaaaata tagttgtgta gaattaagca ttttgatagg aatctacaag 5820
 gtagttgaat ataataagca ggtttgggcc cccaaactth agaaaatcaa atgcaaaggt 5880
 gctggcaaaa atgaggthttg agtggctggc tgtaagagaa ggttaactcc tagtaaaagg 5940
 cattthtaga aataacaatt actgaaaact ttgaagtata gtgggagtag caacaaata 6000
 catgthtttt ttttcttaca aagaactcct aaatcctgag taagtgccat tcattacaat 6060
 aagtctctaa atthtaaaaa aaaaaaatca tatgaggaaa tctagctthc ccctthacgc 6120
 tgcgthtgat cthtgtctaa atagtgttaa aatthctthc atthcaatta cagaactgag 6180
 cccactcgca agthtgagcc atcagtggga tacgccacat thtggagcc ccagcatcgt 6240
 gtacttacca gtgtgttcac aaaatgaaat ttgtgtgaga gctgtacatt aaaaaaatc 6300
 atcattatta thattattht cagtcatgga gaaccaccta cccctgactt ctgthtagtc 6360
 tcctthttaa ataaaaatta ctgtgttaga gaagaaggct atthaatgta gtagthtaact 6420
 atgcctcttg tctgggggtt tcatagagac cggtaggaaa gcgcactcct gctthtcgat 6480
 thatggtgtg tgcaagtaaa caggtgcatt gctthcaacc tgccatacta gththtaaaa 6540
 thcactgaaa thacaaagat acatataat gcatataat aatggaaagt thcccggaat 6600
 gcaacaatta gcaththtaa atcatataa ggcattgcaca thctaaatag tactththtca 6660
 tgcttcattg thtctctggc agataattht actaagaaga aaaatagata thcgactccc 6720
 cthccctaaa caaatccacg ggcagaggct ccagcggagc cgagccccct ggtthtctcg 6780

ES 2 721 639 T3

taggcctag acggtgttc atttatcagt gatgtcaaac gtgctcattt gtcagacata 6840
gctgtaaatg aaaacaatgt gtggcaaaat acaaagtt 6878

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

<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 actccccctg 300
gccaaggccc gcgccgcccg gacagacgcc cgcgcgcct ccagccccga gcggacgccg 360
cgcgcgccct gcctgcagcc cgggccggcg aggcgagccc ttccttatgc aaagcgcgca 420
gcggagcggc gagcggggga cgcgcgcac cgggccgggc tcctccagct tcgccgccgc 480
agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct 540
cggcgcgcaa ggaggcagc gagcaaggag gggccggggc gagcgaggga gcacattggc 600
gtgagcaggg gggagggagc gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg ggggtgtgtg 660
gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cccccagcc 720
cggcaagctg gctcaccgcc tggccaccca 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 ctaccgcag cagctgaacc ccgaggcgt 1140
gggcttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg 1200
cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggccg gggccggtgc 1260
cggcgcctcc ttgggcggca gcggcgagga gatgggcccc gccgccgccg tgggtgccgc 1320
cgtgatcgcc gcggccgccg cgcagagcgg cgcgggcccc cactaccacc accaccacca 1380
ccacgccgcc ggccaccacc accaccggac ggccggcgcg cccggcgccg cgggcagcgc 1440
ggccgcctcg gccggtggcg ctggggggcg gggcggcggt ggcccggcca gcgctggggg 1500
cggcggcggc gccggcggcg gcggagggcg cggggggcg gcggggggcg ggggcgccct 1560

ES 2 721 639 T3

gcacccgcac cacgccgcgc gggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct 1620
 ggtgaccatg tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcmc ggggtcagca aggaggagg 1680
 gatccggctg aagcagaaga gggggaccct gaaaaaccgc ggctatgccc agtcctgccc 1740
 cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca 1800
 agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctgggtcmc gagagggacg cgtacaagga 1860
 gaaatacgag aagttgggtga gcagcggcct ccgagaaaac ggctcagca gcgacaaccc 1920
 gtcctctccc gagtttttca taactgagcc cactcgcagc ttggagccat cagtgggata 1980
 cgccacattt tggaaagccc agcatcgtgt acttaccagt gtgttcacaa aatgaaattt 2040
 gtgtgagagc tgtacattaa aaaaaatcat cattattatt attatttgca gtcatggaga 2100
 accacctacc cctgacttct gtttagtctc ctttttaaataaaaaattact gtgtagaga 2160
 agaaggctat taaatgtagt agttaactat gcctctgtc tgggggtttc atagagaccg 2220
 gtaggaaagc gcactcctgc ttttcgattt atgggtgtgt caagtaaaca ggtgcattgc 2280
 tttcaacctg ccatactagt tttaaaaatt cactgaaatt acaaagatac atatatatgc 2340
 atatatataa tggaaagttt cccggaatgc aacaattagc attttaaaat catatatagg 2400
 catgcacatt ctaaatagta ctttttcatg cttcattgtt tctctggcag ataattttac 2460
 taagaagaaa aatagatatt cgactcccct tccctaaaca aatccacggg cagaggctcc 2520
 agcggagccg agccccctgg ttttctcgta ggcctagac ggtgtgcat ttatcagtga 2580
 tgtcaaactg gctcatttgt cagacatagc tgtaaatgaa aacaatgtgt ggcaaaatac 2640
 aaagttaaaa aaaaaa 2656

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

<400> 3
 gaggctttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggcttggcc 60
 tccccctccc ccctttgctc tctgcctcgt ctttcccag gacttcgcta ttttgctttt 120
 ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcctccagtc gggctgcacc 180
 tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa 240
 aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt 300
 gccaaggccc gcgccgcccg gacagacgcc cgcgcgcct ccagccccga gcggacgccc 360
 cgcgcgcct gcctgcagcc cgggccggcg aggcgagccc ttccttatgc aaagcgcgca 420
 gcggagcggc gagcggggga cgcgcgcac cgggccgggc tcctccagct tcgccgcgc 480
 agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgcggct 540

ES 2 721 639 T3

cggcgcgcaa ggagggcgagc gagcaaggag gggccggggc gagcgaggga gcacattggc 600
 gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg gggggcgggg cagggcgggg ggggtgtgtg 660
 gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgcccgcg aagctagaag cgccccagcc 720
 cggcaagctg gctcaccgcg tggccaccca gcacagcccg ctggcccctc tcctgcagcc 780
 catctggcgg agcggcgggc gcgggcgggg 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
 gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcag cagctgaacc ccgaggcgct 1140
 gggcttcagc cccgaggaag cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg 1200
 cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggccg gggccgggtc 1260
 cggcgcctcc ttgggcggca gcgggcagga gatgggcccc gccgccgccc tgggtgtccgc 1320
 cgtgatcgcc gcggccgccc cgcagagcgg cgcgggcccc cactaccacc accaccacca 1380
 ccacgccgcc ggccaccacc accaccgcag gcccggcgcy cccggcgccc cgggcagcgc 1440
 ggccgcctcg gccgggtggc ctggggggcg gggcgggcgt ggccccgcca gcgctggggg 1500
 cggcggcggc ggccggcgcg gcggagggcg cggggcgcg gcggggcgcg ggggcgcct 1560
 gcacccgcac cacgccgccc gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct 1620
 ggtgaccatg tctgtgcgcy agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggagg 1680
 gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc ggctatgccc agtcctgccc 1740
 cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca 1800
 agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctgggtgcgc gagagggacg cgtacaagga 1860
 gaaatacgag aagttggtga gcagcggctt ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaaccc 1920
 gtcctctccc gagtttttca tgtgagtctg acacgcgatt ccagctagcc accctgataa 1980
 gtgctccgcy ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgctagt tctagagcca tgctcgccac 2040
 cacctacca cccccacccc caccgagttt ggcccccttg gccccctaca cacacacaaa 2100
 cccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac acacccaca ccctgctcga 2160
 gtttgtggtg gtgggtggctg ttttaactg gggagggaat ggggtgtctg ctcatggatt 2220
 gccaatctga aattctccat aacttgctag cttgtttttt tttttttttt acaccccccc 2280
 gccccacccc cggacttgca caatgttcaa tgatctcagc agagttcttc atgtgaaacg 2340
 ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atattttttc ttcttcttcc ccttcagttc 2400

ES 2 721 639 T3

atgaactggg	gttcattttc	tgtgtgtgtg	tgtgttttat	tttgtttga	ttttttttt	2460
taattttact	tttagagctt	gctgtgttgc	ccacctttt	tccaacctcc	accctcactc	2520
cttctcaacc	catctcttcc	gagatgaaag	aaaaaaaaa	gcaaagtttt	tttttcttct	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	atgaaaaaga	gacattatat	taataaaaaa	aaaaagcctg	catgctggac	2940
atgtatggta	taattatfff	ttcctttttt	tttccttttg	gcttggaat	ggacgttcga	3000
agacttatag	catggcattc	atacttttgt	tttattgcct	catgactttt	ttgagtttag	3060
aacaaaacag	tgcaaccgta	gagccttctt	cccatgaaat	tttgcactctg	ctccaaaact	3120
gctttgagtt	actcagaact	tcaacctccc	aatgcactga	aggcattcct	tgtcaaagat	3180
accagaatgg	gttacacatt	taacctggca	aacattgaag	aactcttaat	gttttctttt	3240
taataagaat	gacgccccac	tttggggact	aaaattgtgc	tattgccgag	aagcagtcta	3300
aaatttattt	tttaaaaaga	gaaactgccc	cattatffff	ggtttgtttt	atfffftattt	3360
tatatfffft	ggcttttggg	cattgtcaaa	tgtggaatgc	tctgggtttc	tagtatataa	3420
tttaattcta	gtttttataa	tctgttagcc	cagttaaaat	gtatgctaca	gataaaggaa	3480
tgttatagat	aaatttgaaa	gagttaggtc	tgttttagctg	tagatfffft	aaacgattga	3540
tgactaaat	tgtttactat	tgtgatgtta	aggggggtag	agtttgcaag	gggactgttt	3600
aaaaaaagta	gcttatacag	catgtgcttg	caacttaaat	ataagttggg	tatgtgtagt	3660
ctttgctata	ccactgactg	tattgaaaac	caaagtatta	agaggggaaa	cgcccctggt	3720
tatatctgta	gggtatffff	acattcaaaa	atgtatgttt	tttttcttt	tcaaaattaa	3780
agtatffffg	actgaattgc	actaagatat	aacctgcaag	catataatac	aaaaaaaaat	3840
tgcaaaaactg	tttagaacgc	taataaaaatt	tatgcagtta	taaaaatggc	attactgcac	3900
agttttaaga	tgatgcagat	ttttttacag	ttgtattgtg	gtgcagaact	ggatffffctg	3960
taacttaaaa	aaaaatccac	agttttaaag	gcaataatca	gtaaatgtta	ttttcagggg	4020
ctgacatcct	gtctttaaaa	agaaatgaaa	agtaaatcct	accacaataa	atataaaaaa	4080
atcttctcag	ttacttttct	tttacaatatt	ttgctgtgca	aaattgtttt	atatcttgag	4140
ttactaacta	accacgcgtg	ttgttctctat	gtgcttttct	ttcattttca	attctgggta	4200
tatcaagaaa	agaataatct	acaataataa	acggcatttt	tttttgattc	tgtactcagt	4260
ttcttagtgt	acagtttaac	tgggcccac	aacctcgtta	aaagtgtaaa	atgcatcctt	4320

ES 2 721 639 T3

ttctccagtg	gaaggattcc	tggaggaata	gggagacagt	aattcagggg	gaaattatag	4380
gctgtttttt	gaagtgagga	ggctggcccc	atatactgat	tagcaatatt	taatatagat	4440
gtaaattatg	acctcatttt	tttctcccca	aagttttcag	ttttcaaatg	agttgagcca	4500
taattgccct	tggtaggaaa	aacaaaacaa	aacagtggaa	ctaggcttcc	tgagcatggc	4560
cctacacttc	tgatcaggag	caaagccatc	catagacaga	ggagccggac	aaatatggcg	4620
catcagaggt	ggcttgcgca	catatgcatt	gaacggtaaa	gagaaacagc	gcttgccttt	4680
tcactaaagt	tgactatttt	tccttcttct	cttacacacc	gagattttct	tgtagcaag	4740
gcctgacaag	atttaacata	aacatgacaa	atcatagttg	tttgttttgt	tttgcttttc	4800
tctttaacac	tgaagatcat	ttgtcttaaa	taggaaaaag	aaaatccact	ccttacttcc	4860
atatttcaa	gtacatatct	ggtttaaact	atgttatcaa	atcatatttc	accgtgaata	4920
ttcagtgag	aacttctcta	cctggatgag	ctagtaatga	tttcagatca	tgctatcccc	4980
agaaataaaa	gcaaaaaata	atacctgtgt	ggaatatagg	ctgtgctttg	atttactggt	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
ttatttttaa	gaaaacaggt	tgtgtttggt	gctgctaagt	tctggccagt	ttatcatctg	5400
gccttcctgc	ctatttttta	caaaacacga	agacagtgtg	taacctcgac	attttgacct	5460
tcctttatgt	gctagttag	acaggctcct	gaatccacac	ttaattttgc	ttaacaaaag	5520
tcttaatagt	aaacctcccc	tcatgagctt	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	gtttgggccc	ccaaacttta	gaaaatcaaa	tgcaaagggtg	5880
ctggcaaaaa	tgaggtttga	gtggctggct	gtaagagaag	gttaactcct	agtaaaaggc	5940
atttttagaa	ataacaatta	ctgaaaactt	tgaagtatag	tgggagtagc	aaacaaatac	6000
atgttttttt	tttcttacia	agaactccta	aatcctgagt	aagtgccatt	cattacaata	6060
agtctctaaa	tttaaaaaaa	aaaaaatcat	atgaggaaat	ctagctttcc	cctttacgct	6120
gcgtttgatc	tttgtctaaa	tagtggttaa	attcctttca	ttccaattac	agaactgagc	6180

ES 2 721 639 T3

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

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

<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

ES 2 721 639 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 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 Pro Ala Ser Ala
 210 215 220

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
 370 375 380

ES 2 721 639 T3

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

<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 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 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

ES 2 721 639 T3

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 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 Met
 370

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

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

<400> 6
 acggcucgag cagcgacaa

<210> 7

<211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip específico de c-MAF

 <400> 7
 cuuaccagug uguucacaa 19

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

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

 <400> 8
 uggaagacua cuacuggaug 20

 <210> 9
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

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

 <400> 9
 auuugcaguc auggagaacc 20

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

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

 <400> 10
 caaggagaaa uacgagaagu 20

 <210> 11
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

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

 <400> 11
 acaaggagaa auacgagaag 20

 <210> 12
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNip específico de c-MAF

<400> 12

accuggaaga cuacuacugg

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto con cáncer de mama ER+, que comprende
- (i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tejido tumoral de dicho sujeto y
(ii) comparar el nivel de expresión previamente obtenido con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra de control, en donde si el nivel de expresión aumenta con respecto al nivel 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 ósea, en donde dicha terapia es un agente inhibidor de c-MAF.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la metástasis ósea es metástasis osteolítica.
- 15 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la cuantificación de los niveles de expresión del gen c-MAF comprende cuantificar el ARN mensajero (ARNm) de dicho gen, o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario (ADNc) de dicho gen o un fragmento de dicho ADNc.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde los niveles de expresión se cuantifican mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o una matriz de ADN o ARN, o hibridación.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la cuantificación de los niveles de expresión del gen c-MAF comprende la cuantificación de los niveles de proteína codificada por dicho gen o de una variante del mismo.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde los niveles de proteína se cuantifican mediante transferencia Western, técnicas inmunohistoquímicas, ELISA o una matriz de proteínas.
- 30 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente inhibidor de c-MAF se selecciona del grupo que consiste en un ARNpi específico para c-MAF, un oligonucleótido antisentido específico para c-MAF, una ribozima específica para c-MAF, un anticuerpo inhibidor de c-MAF, una variante dominante negativa de c-MAF, ARN catalíticos, enzimas de ADN, péptidos inhibidores y un compuesto de la Tabla 1 o de la Tabla 2.

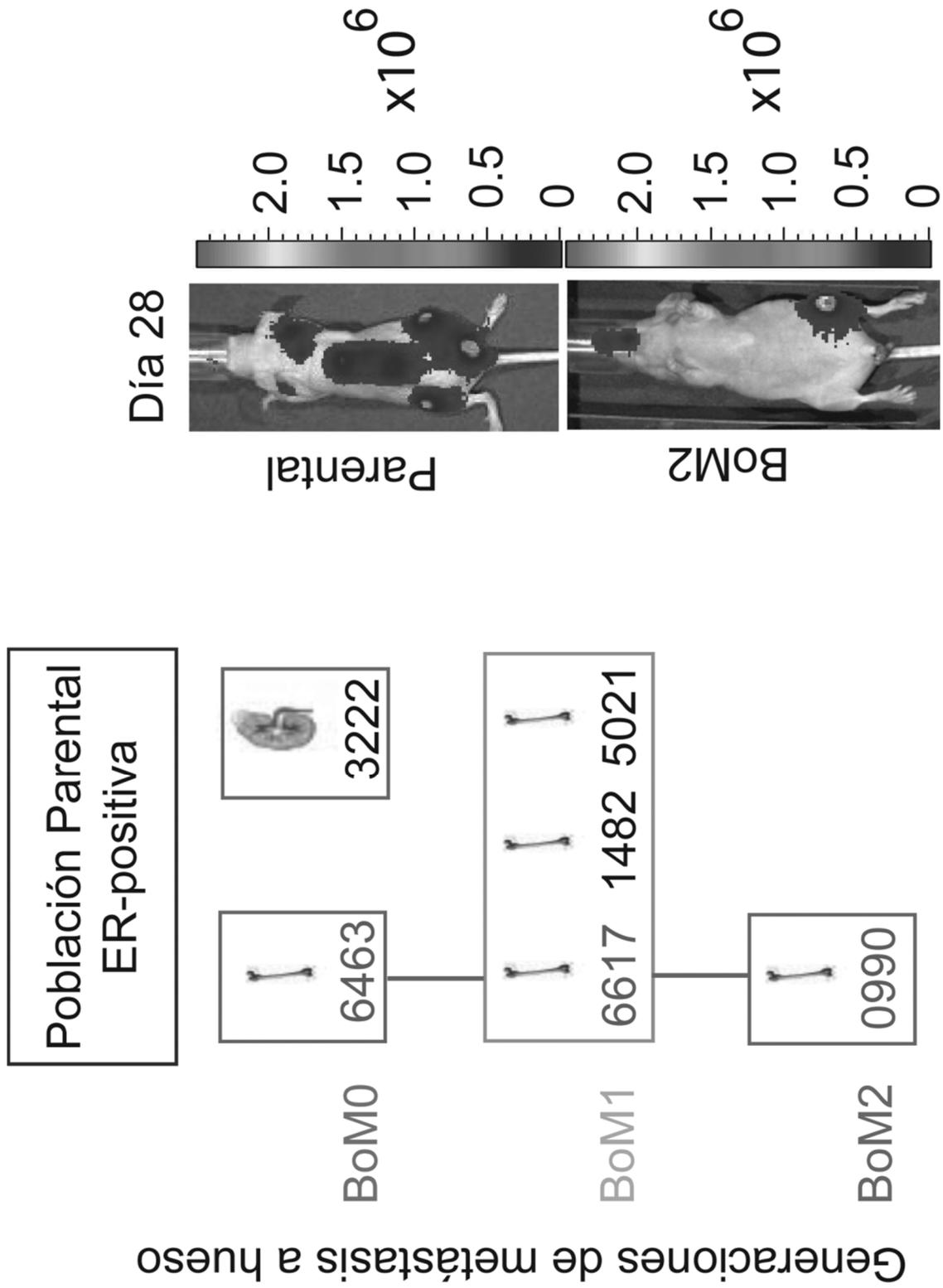
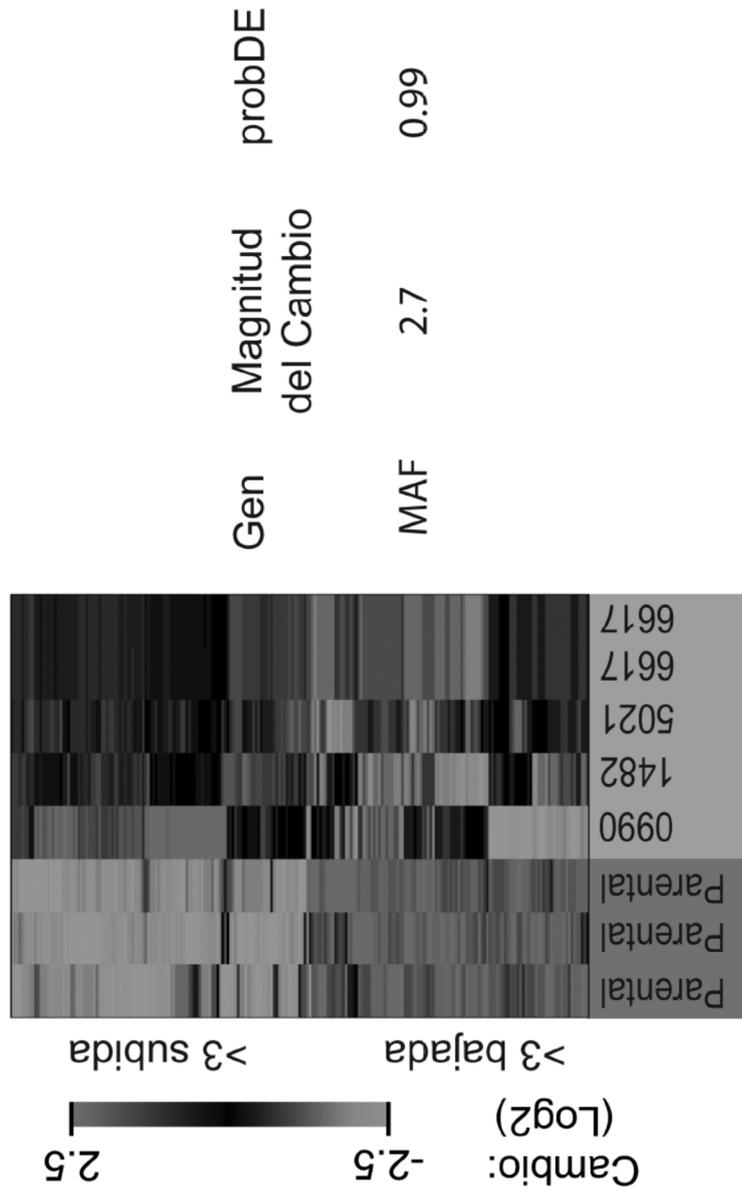


FIG. 1A

FIG. 1B



Gen MAF Magnitud del Cambio probDE

MAF 2.7 0.99

B

C

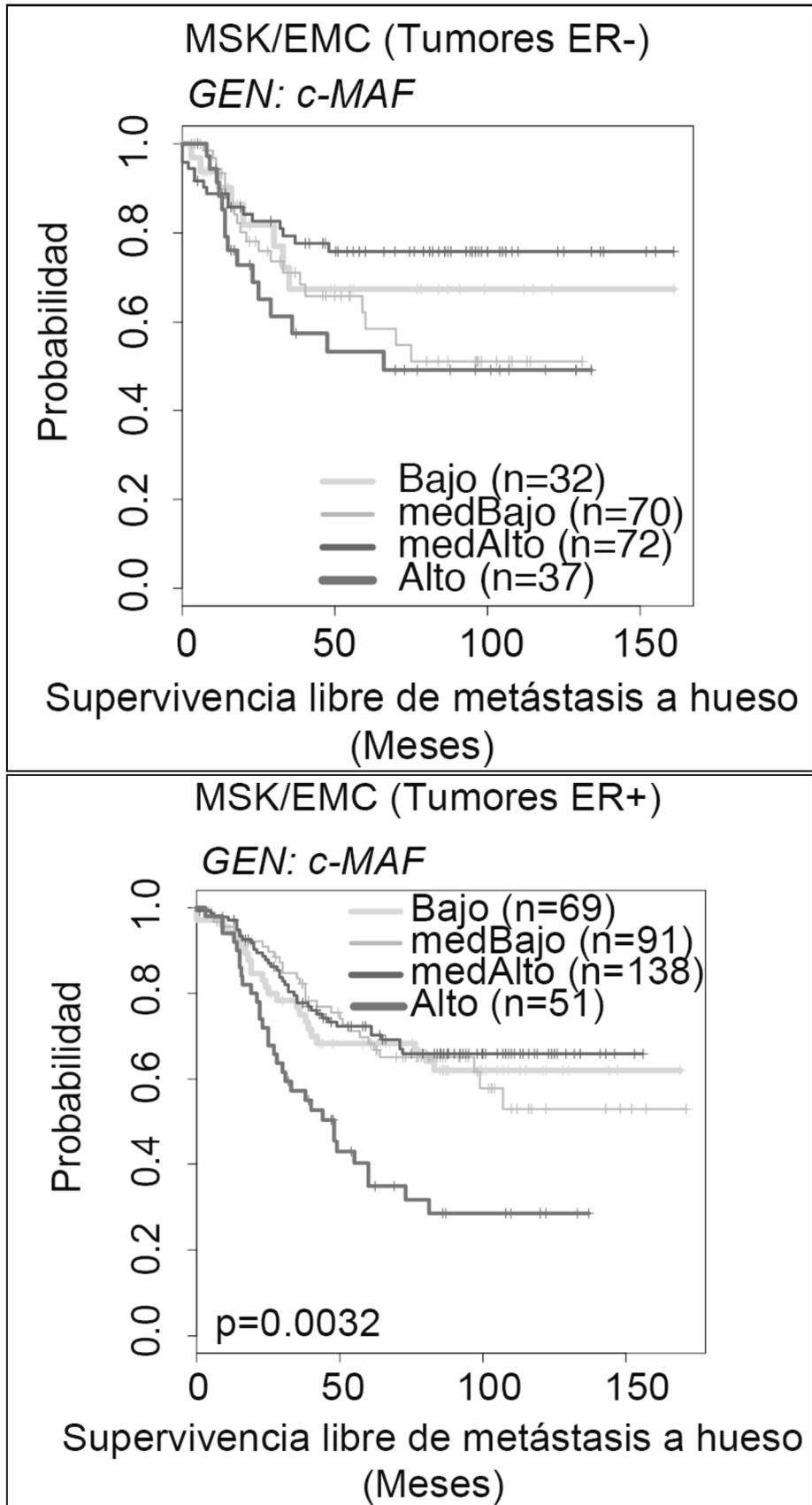


FIG. 1C

D

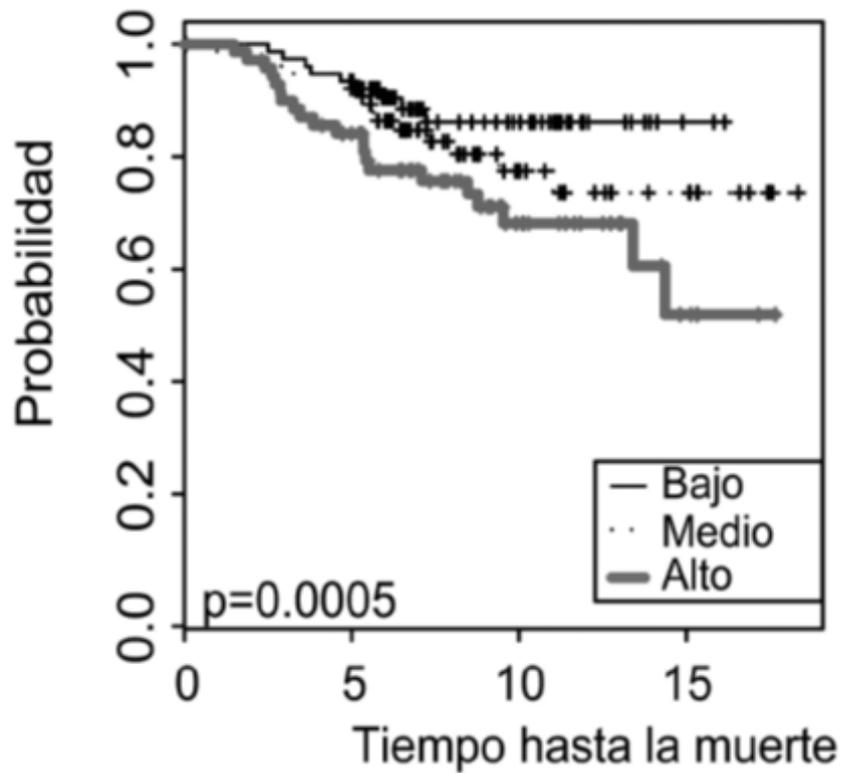
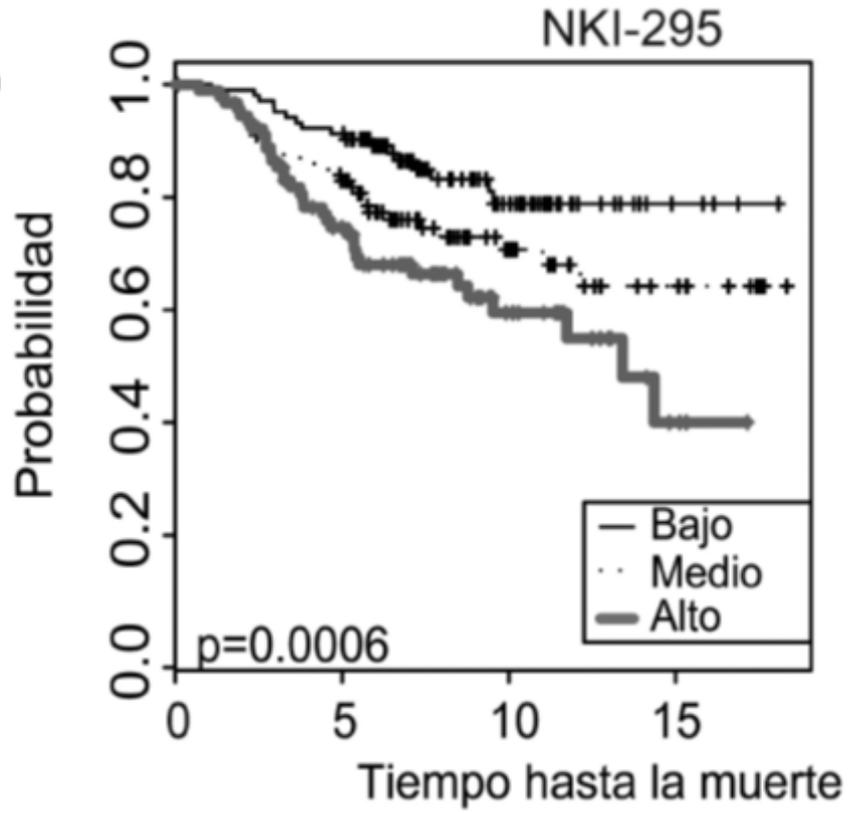


FIG. 1D

A

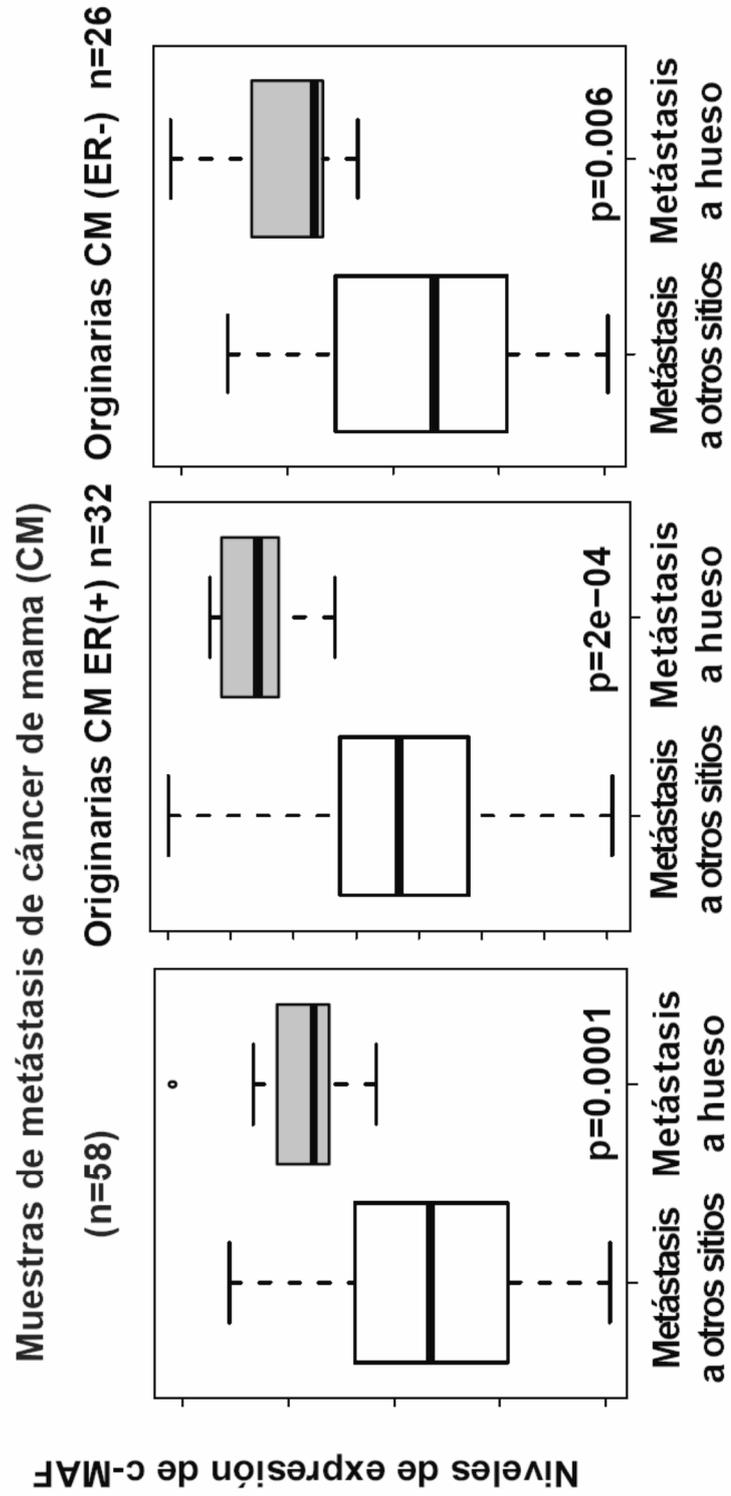


FIG. 2

FIG. 2 (cont.)

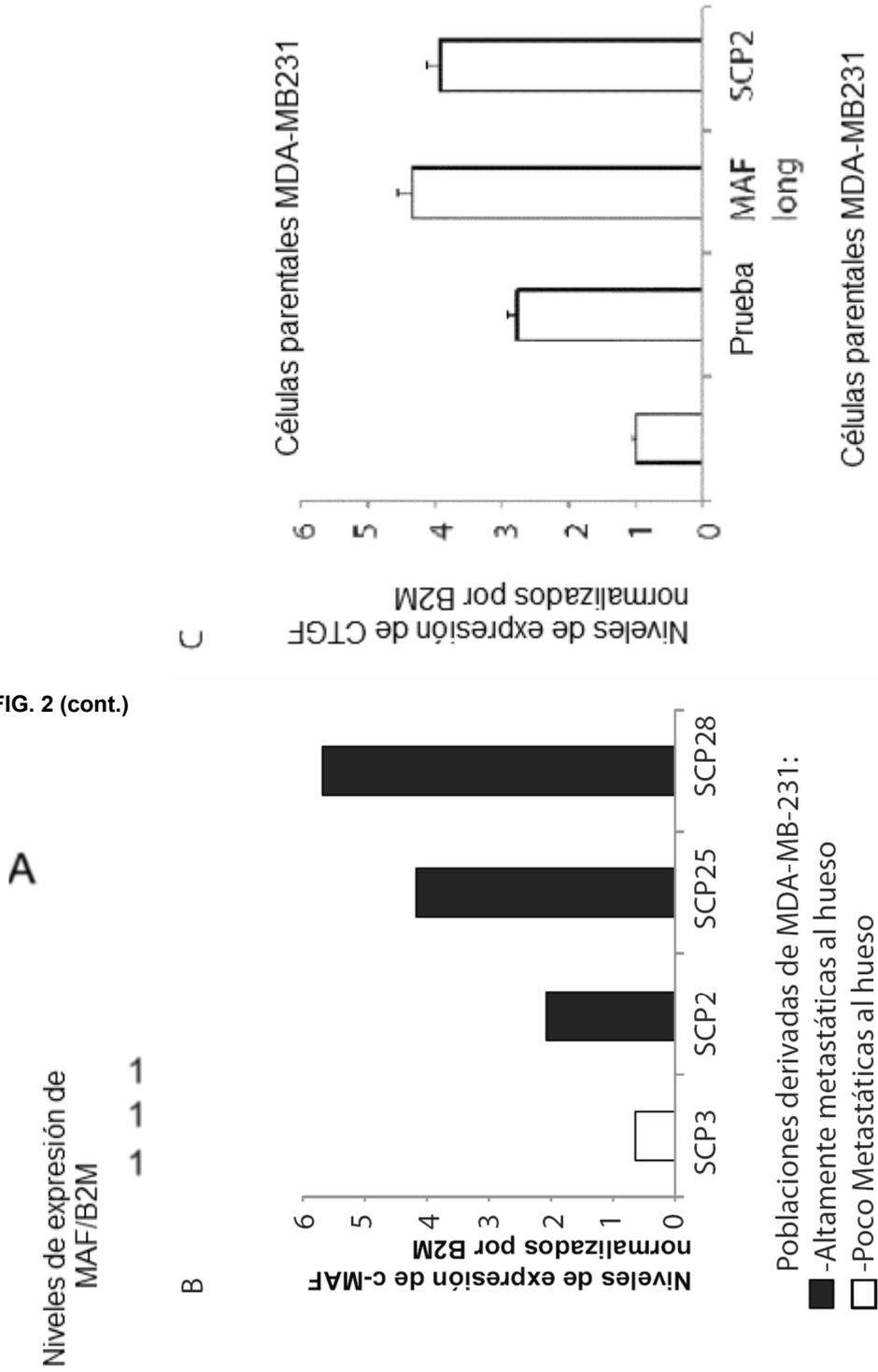


FIG. 3

B

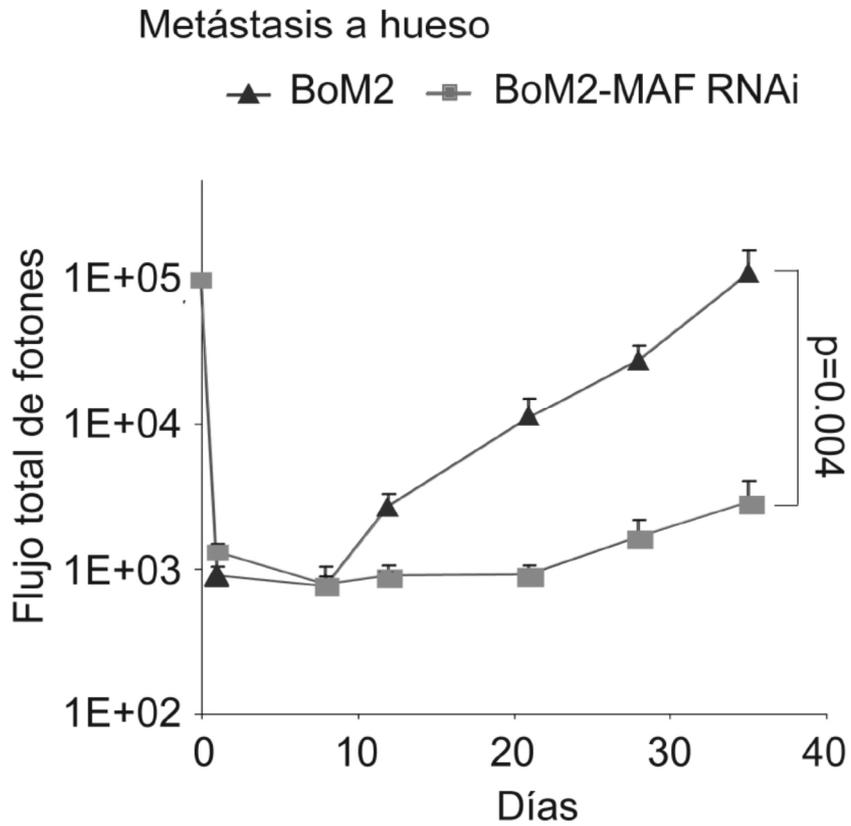
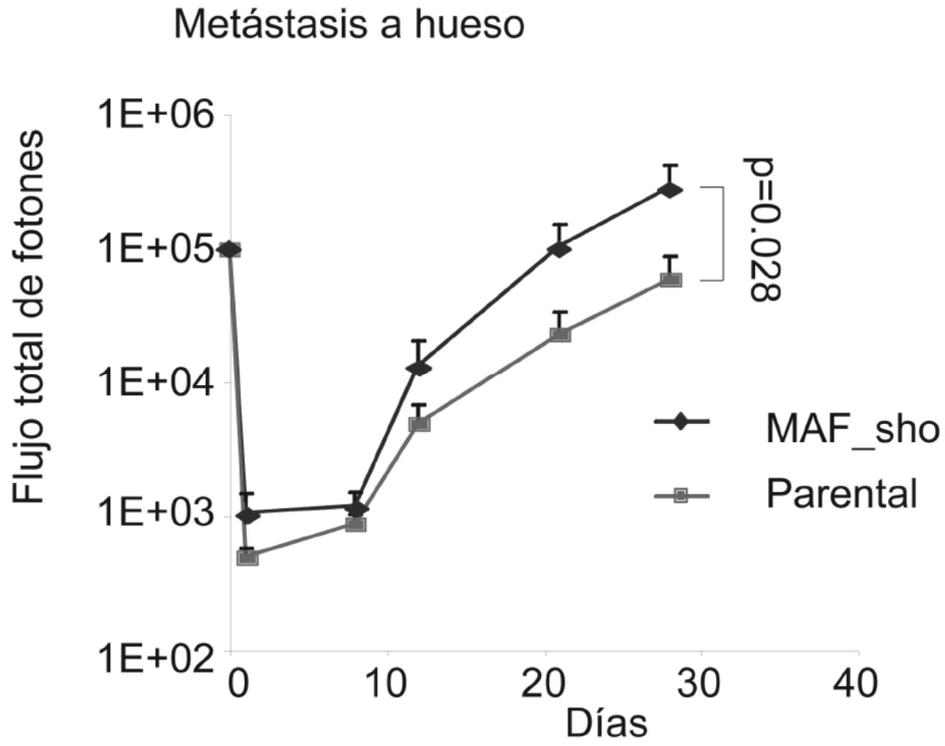


FIG. 3 (cont.)

C

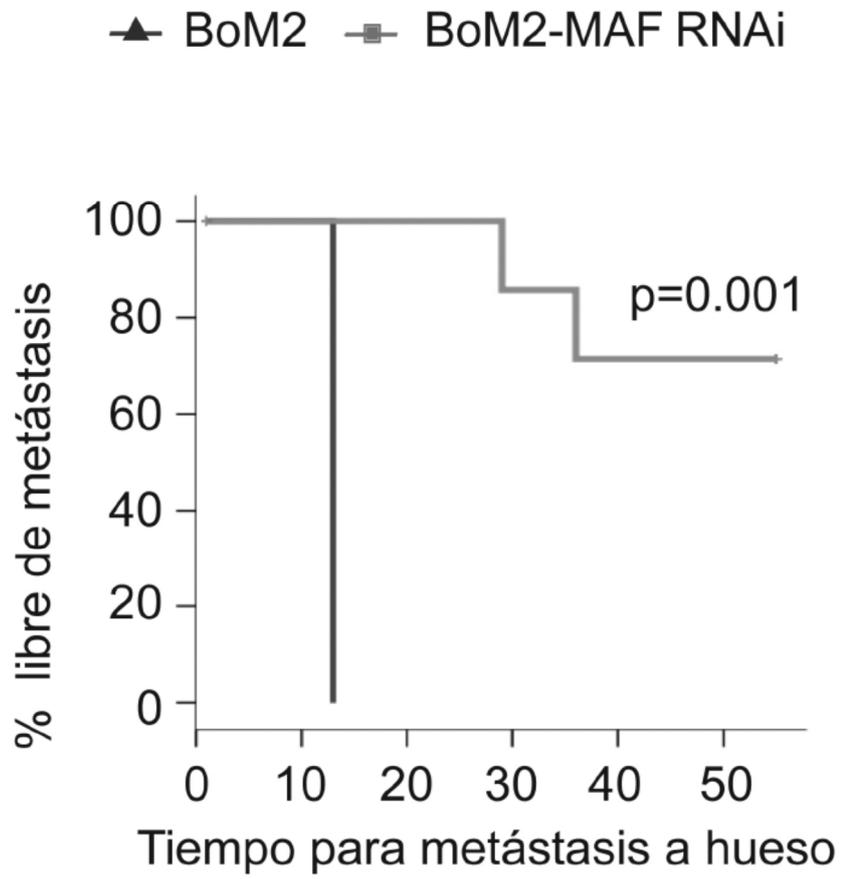


FIG. 3 (cont.)

Células MCF7 (ER+)

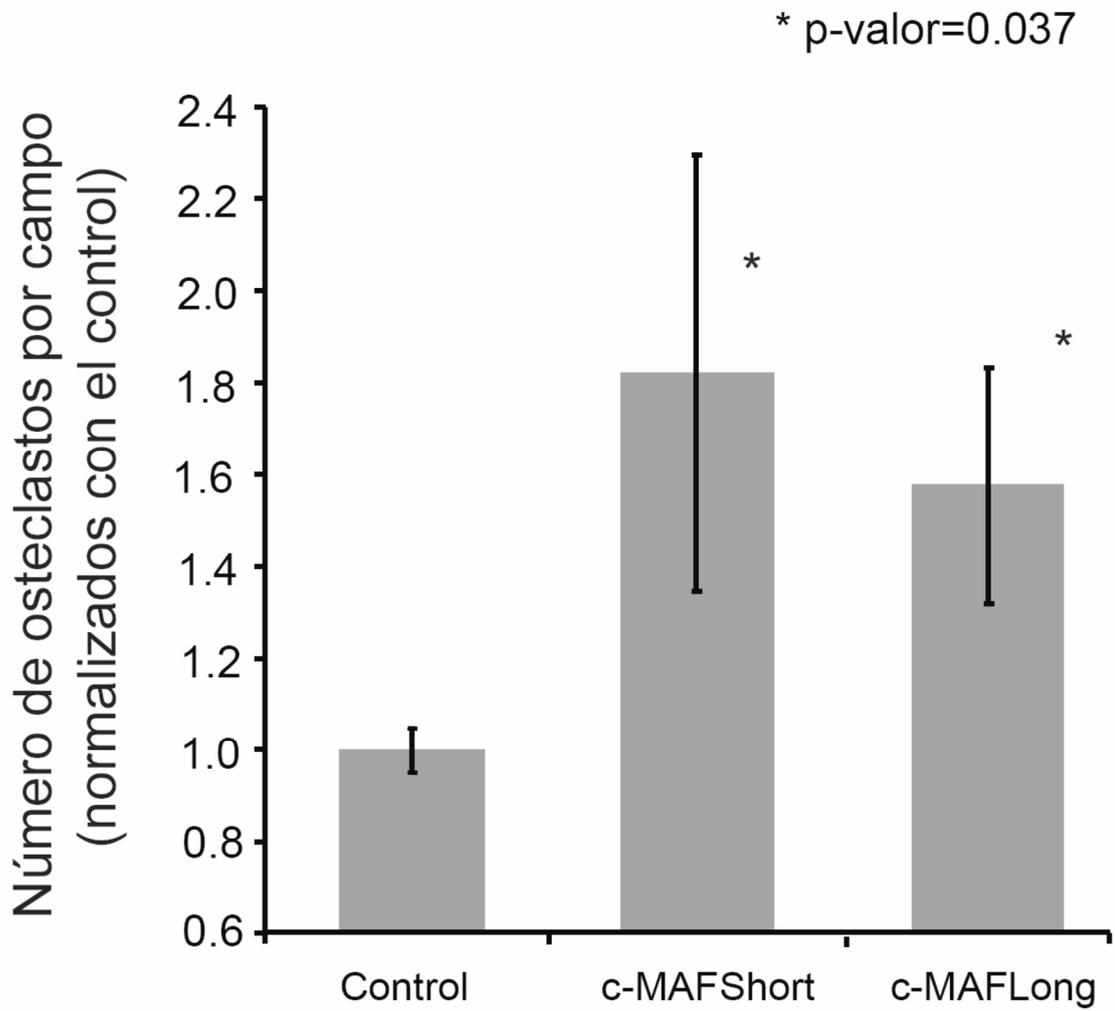


FIG. 4

A Niveles de expresión de genes y su localización en células BoM2 en comparación a MCF7

cromosoma 16

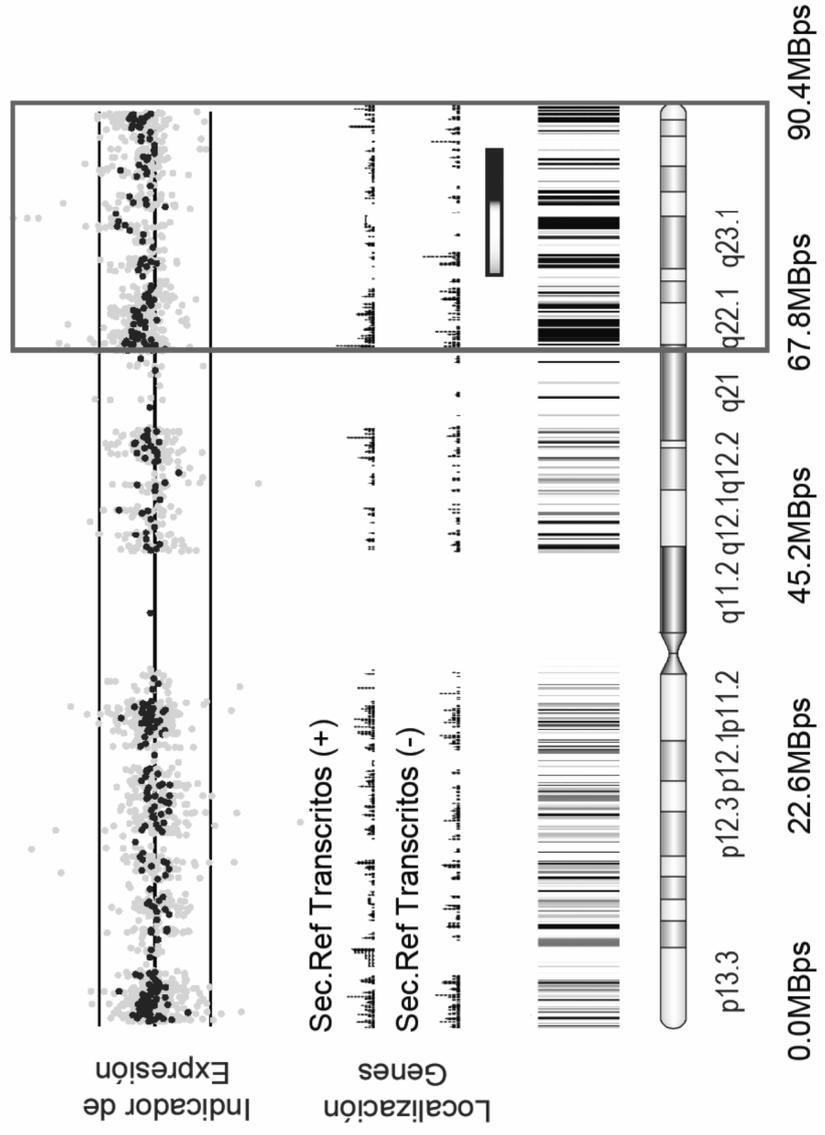
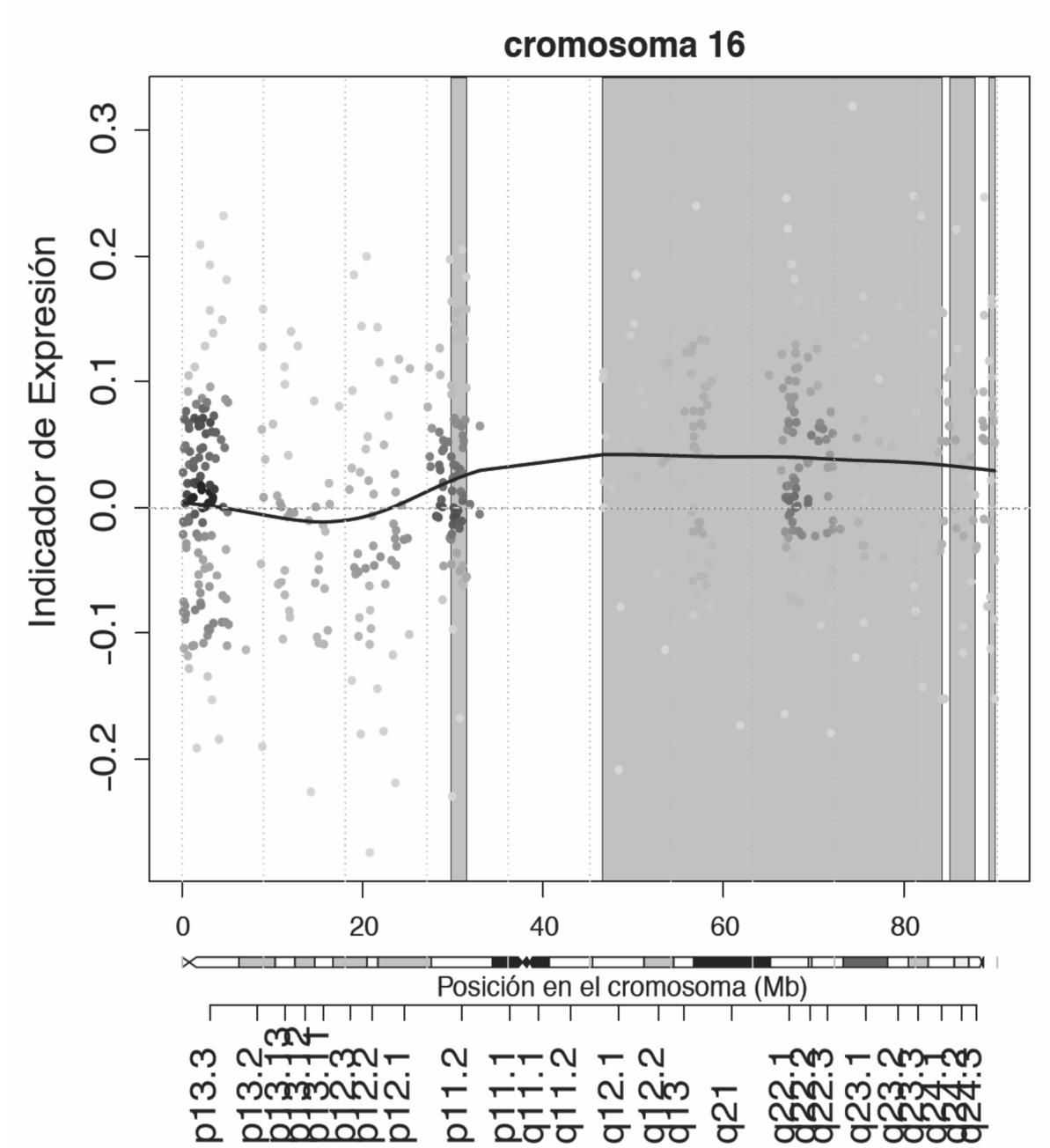
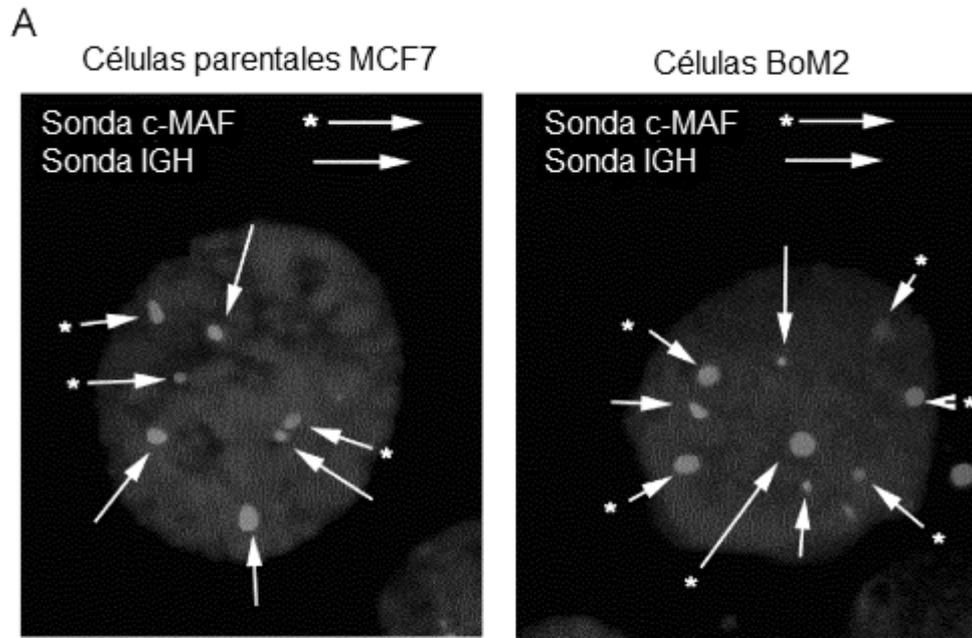


FIG. 5



B

FIG. 5 (cont.)



B

Tasa entre número de copias de genes MAF / IGH	Parentales MCF7 (n=199)	BoM2 (n=70)
≤ 1.5	67.3%	11.4%
> 1.5	32.7%	88.6%
≥ 2	21.1%	75.7%

FIG. 6