

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 202**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/74** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/US2013/031812**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14031164**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13831781 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2888594**

54 Título: **Método para determinar el tratamiento de cáncer de mama**

30 Prioridad:

**23.08.2012 US 201261692331 P**

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

**14.01.2019**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
COLORADO, A BODY CORPORATE (100.0%)  
1800 Grant Street, 8th Floor  
Denver, CO 80203, US**

72 Inventor/es:

**MOUCHANTAT, JENNIFER RICHER**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI , Peter**

ES 2 696 202 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 determinar el tratamiento de cáncer de mama

## 5 Remisión a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/692.331, presentada el 23 de agosto de 2012.

## 10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para determinar un procedimiento de tratamiento para el cáncer de mama, un método de predicción de una respuesta clínica a un tratamiento de cáncer de mama y un método para seleccionar un agente de tratamiento endocrino en el tratamiento del cáncer de mama. En general, los métodos de la presente invención comprenden determinar la relación de receptores de estrógenos (ER) y receptores de andrógenos (AR). En particular, la relación de AR a ER puede usarse para determinar el tratamiento eficaz para el cáncer de mama; predecir una respuesta clínica a un modo particular de tratamiento para el cáncer de mama; y seleccionar un agente de tratamiento endocrino para el tratamiento de cáncer de mama.

## 20 Antecedentes de la invención

El cáncer de mama es una enfermedad extremadamente complicada. Pero en su más simple expresión, puede dividirse en dos tipos: cáncer de mama positivo al receptor de estrógenos (ER), que representa aproximadamente un 70 % de todos los cánceres de mama, y cáncer de mama negativo a ER. Los tratamientos endocrinos, a veces llamados terapias hormonales, abordan el cáncer positivo al receptor de estrógenos. Por tanto, en el pasado, se ha usado ER como biomarcador para determinar si tratar el cáncer de mama con tratamiento endocrino o algún otro tratamiento de base no endocrina.

Recientemente se ha demostrado que en los cánceres de mama, el receptor de andrógenos (AR) se expresa más ampliamente que el receptor de estrógenos (ER) alfa o el receptor de progesterona (PR). Por consiguiente, AR recientemente ha surgido como un marcador útil para el refinamiento adicional de la clasificación del subtipo de cáncer de mama (1, 2). Se ha descubierto que en un estudio particular que implica 2171 cánceres de mama invasivos de mujeres incluidas en el Nurses' Health Study, un 77 % eran positivos para AR por inmunohistoquímica (IHC) (3). Entre los subtipos, un 88 % de ER+ (es decir, positivos al receptor de estrógenos), un 59 % de HER2+ y un 32 % de cánceres de mama triple negativo (ER-/PR-/HER2-) eran positivos para la expresión de AR por IHC (3). Similar a ER y PR, la expresión de AR está asociada con un estado bien diferenciado (4) y cánceres de mama más inactivos (5).

Como los tumores ER+ se estimulan por estrógenos, tratamientos tales como el antagonista de ER tamoxifeno o inhibidores de la aromatasas (AI), que bloquean la conversión de andrógenos en estrógenos, generalmente son eficaces para inhibir la progresión de dichos tumores. Sin embargo, un 30-50 % de todos los pacientes con cáncer de mama ER+ presentan resistencia *de novo* a estos tratamientos endocrinos tradicionales y finalmente todos los cánceres de mama ER+ metastásicos adquieren resistencia (6, 7).

De forma interesante, incluso entre los tumores ER+, algunos cánceres de mama responden bien a un tratamiento endocrino tradicional mientras que otros no (58). Actualmente, no hay un método fiable para determinar si un cáncer de mama responderá mejor a un tratamiento endocrino tradicional o un tratamiento antiandrógenos. Por tanto, en la mayoría de los casos, la primera línea de tratamiento por quimioterapia para el cáncer de mama usa un tratamiento endocrino tradicional, que es eficaz en únicamente algunos de los pacientes con cáncer de mama. Como con la mayoría de los tratamientos de quimioterapia, la administración de un tratamiento endocrino tradicional a aquellos que probablemente no responderán positivamente causa una sobrecarga y carga física y financiera excesiva.

Por consiguiente, existe una necesidad de un método para determinar si un cáncer de mama particular responderá positivamente a un tratamiento endocrino.

55

## Sumario de la invención

Algunos aspectos de la invención proporcionan métodos para determinar si un cáncer de mama responderá probablemente a un tratamiento dirigido a ER o si podría responder mejor a un tratamiento antiandrógenos. Como se usa en este documento, la expresión "tratamiento dirigido a ER" se refiere a una quimioterapia que usa un agente antiestrógenos convencional (por ejemplo, antagonistas del receptor de estrógenos tales como tamoxifeno o fulvestrant) o una clase de fármaco de inhibidor de aromatasas (AI).

La presente invención se basa al menos en parte en el descubrimiento por el autor de la presente invención de que tumores que responden a un tratamiento endocrino tradicional (es decir, antiestrógenos o AI) tiene una correlación

positiva entre AR y ER (por ejemplo, cuando AR es elevado, ER también es elevado y cuando AR es bajo, ER también es bajo) mientras que los tumores que responden menos bien a un tratamiento endocrino (medido por encogimiento del tumor o un tiempo más corto hasta la recidiva o supervivencia sin enfermedad más corta) no muestran esta correlación, o tienen significativamente más AR que ER (por ejemplo, relación AR:ER >3, típicamente >2 y a menudo >1,3).

Algunos aspectos de la invención divulgan un método para determinar la forma más eficaz de tratamiento endocrino para cáncer de mama (un tratamiento dirigido a ER, es decir, endocrino o un tratamiento dirigido a AR, por ejemplo, usando un antagonista de AR). Otras aspectos más de la invención divulgan un método para predecir o controlar la respuesta clínica a un modo particular de tratamiento de cáncer de mama. Aún en otros aspectos de la invención se proporciona un método para determinar el tratamiento de quimioterapia a usar en un paciente con cáncer de mama particular.

Un aspecto particular de la invención divulga un método para predecir una respuesta clínica de un paciente con cáncer de mama a un modo dado de tratamiento.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir la probabilidad de responder positivamente a un tratamiento endocrino de un paciente con cáncer de mama que comprende: (a) determinar la relación entre el receptor de andrógenos (AR) y el receptor de estrógenos (ER) presente en una muestra tisular del paciente; y (b) comparar la cantidad de AR y ER en la muestra tisular; en el que una correlación positiva entre AR y ER es indicativa de una probabilidad de una respuesta positiva a un tratamiento endocrino antiestrógenos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para seleccionar un agente de quimioterapia para tratar el cáncer de mama en un sujeto que necesita dicho tratamiento, comprendiendo dicho método: (a) determinar la relación entre el receptor de andrógenos (AR) y el receptor de estrógenos (ER) presente en una muestra tisular del sujeto; y (b) seleccionar un modulador de ER para tratar al sujeto cuando la relación entre AR y ER en la muestra tisular es inferior a 1,3 o seleccionar un modulador de AR para tratar al sujeto cuando la relación entre AR y ER en la muestra tisular es mayor de 1,3.

En general, los métodos de la invención incluyen determinar la relación del receptor de andrógenos (AR) y el receptor de estrógenos (ER) en una muestra celular del paciente. Una correlación positiva entre AR y ER (por ejemplo, cuando ER está elevado, AR también está elevado y viceversa) es indicativa de una probabilidad de una respuesta positiva a un tratamiento endocrino dirigido a ER tradicional (tal como antiestrógenos como tamoxifeno o fulvestrant, o AI). En contraste, las células tumorales que no muestran la correlación positiva (o "una correlación inversa") entre AR y ER (es decir, relación AR:ER de >1,3) es indicativa de una probabilidad de una respuesta positiva a un tratamiento antiandrógenos.

Otro aspecto de la invención divulga un método para determinar un procedimiento de tratamiento para un paciente con cáncer de mama. Dicho método incluye determinar la relación del receptor de andrógenos (AR) y el receptor de estrógenos (ER) en una muestra celular del paciente. Si hay una correlación positiva entre AR y ER, entonces el paciente se trata con un tratamiento endocrino tradicional, mientras que si no hay correlación positiva o hay una correlación inversa de AR:ER, por ejemplo, la relación es mayor de 1,3, entonces el paciente se trata con un tratamiento antiandrógenos. Típicamente, el tratamiento antiandrógenos comprende administrar un inhibidor del receptor de andrógenos al paciente que padece cáncer de mama, mientras que un tratamiento endocrino tradicional comprende administrar un inhibidor del receptor de estrógenos (tal como tamoxifeno o fulvestrant o raloxifeno), un inhibidor de aromatasa o una combinación de los mismos.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra gráficos de AR frente ER en una muestra celular y portaobjetos de inmunotinción de AR y ER de células de tumor de mama (**A** y **B**) y células normales adyacentes (**C**). Se tomaron biopsias centrales de pacientes antes de recibir cuatro meses de tratamiento endocrino neoadyuvante y se tiñeron para AR y ER. El valor de tinción (porcentaje de tinción positiva X intensidad) para AR se representó frente a la de ER y se muestra para pacientes que respondían (**A**, izquierda), aquellos que no (**B**, izquierda), y células normales adyacentes (**C**, izquierda). La pendiente de la línea ( $\beta$ ) se indica, así como el valor P, y la correlación de Spearman. También se muestran imágenes representativas de tinción de AR y ER en los que respondían (**A**, derecha), los que no respondían (**B**, derecha), y aquellos de células normales adyacentes (**C**, derecha).

La figura 2 muestra el resultado del ensayo de proliferación inducido por estrógenos.

#### Descripción detallada de la invención

El autor de la presente invención descubrió que en tumores ER+ que respondían a tratamiento endocrino no adyuvante, disminuía tanto la expresión de ARNm como de proteína de ER y AR. Sin embargo, en tumores que no logran responder a tratamiento endocrino, la expresión de ARNm y proteína de AR permanecía elevada (8, 9).

Adicionalmente, la sobreexpresión de AR aumentaba la resistencia a tamoxifeno en modelos de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* (10). De forma interesante, el autor de la presente invención también observó que los niveles de AR aumentaban en respuesta a E2 y también en respuesta a tamoxifeno en tumores de xenoinjerto. Sin limitarse a teoría alguna, se cree que esto es una indicación de que la actividad agonista parcial de tamoxifeno da lugar a regulación por aumento de AR (8). Estos datos indican que la resistencia *de novo* o adquirida a tratamientos antiestrógenos en tumores de mama es un resultado de un cambio de dependencia de estrógenos a andrógenos.

Hay un subconjunto de cánceres de mama negativos a ER llamados apocrinos moleculares o de receptor de andrógenos luminales (LAR) que retienen AR (11-14), y el patrón de expresión génica activada por AR en estos tumores se parece mucho a la de cánceres de mama ER+ (15, 16). El compuesto antiandrógenos bicalutamida inhibe el crecimiento de líneas celulares apocrinas moleculares *in vitro* y los datos preclínicos en ratones con una línea celular representativa, MDA-MB-453, indican que los antiandrógenos pueden ser tratamientos dirigidos útiles para dichos tumores (2, 17-20). Sin embargo, la bicalutamida tiene propiedades agonistas parciales y la resistencia a bicalutamida es una frecuente circunstancia en cánceres de próstata (21, 22).

La enzalutamida es un inhibidor de la señalización de AR novedoso que inhibe AR con una afinidad 5 veces mayor que la bicalutamida, altera la translocación nuclear de AR, inhibe la unión a ADN en células de cáncer de próstata y carece de actividad agonista a dosis eficaces (23-25). La enzalutamida ha demostrado mejorar significativamente la supervivencia global en un ensayo clínico en fase III en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) (26).

Algunos aspectos de la invención divulgan un método para identificar tumores, en particular cánceres de mama, que responden a un tratamiento antiestrógenos y aquellos que responden mejor a tratamiento antiandrógenos. Como se usa en este documento, el término "responder" cuando se refiere a un tratamiento particular significa que el tratamiento es eficaz en el tratamiento del tumor de modo que ralentiza o detiene el crecimiento tumoral o se consigue regresión del crecimiento tumoral (es decir, reducción en el tumor). Como se usa en este documento, la expresión "tratamiento antiestrógenos" se refiere a un tratamiento endocrino que usa un antagonista del receptor de estrógenos (ER) tal como tamoxifeno. Otros antagonistas de ER incluyen ICI o inhibidores de la síntesis de estrógenos tales como inhibidores de la aromatasa, así como aquellos conocidos para los expertos en la materia. Como se usa en este documento, la expresión "tratamiento antiandrógenos" se refiere a un tratamiento que usa un antagonista del receptor de andrógenos (AR). Los antagonistas de andrógenos ejemplares incluyen enzalutamida, bicalutamida o inhibidores de la síntesis de andrógenos tales como abiraterona, así como aquellos conocidos para los expertos en la materia. Debe apreciarse que las expresiones "antagonistas de ER" y "antagonistas de AR" no excluyen que dicho compuesto sea activo contra otros receptores. La expresión simplemente indica que la actividad de un antagonista de ER es más activa hacia ER que hacia otros receptores, tales como AR, y asimismo un antagonista de AR es más activo hacia AR que hacia otros receptores, tales como ER. Típicamente, la actividad para un receptor particular es al menos dos veces, a menudo al menos cinco veces, y más a menudo al menos diez veces la del otro receptor.

Los aspectos de la presente invención se basan al menos en parte en el descubrimiento por el autor de la presente invención de que los tumores que responden a tratamiento antiestrógenos tienen una relación AR:ER en tumores que responden a tratamiento antiestrógenos de menos de 1,3. La relación de AR:ER puede determinarse fácilmente por inmunotinción. Por tanto, se puede valorar o determinar la inmunotinción para AR y ER multiplicando el porcentaje de células teñidas x la intensidad de tinción. Como alternativa, simplemente se puede determinar el porcentaje de células que se tiñen positivamente para AR y/o ER. Se descubrió que los tumores que no responden a tratamiento antiestrógenos tienen una relación o correlación no significativa entre ER y AR.

Otros aspectos de la invención proporcionan un método para determinar un tratamiento de quimioterapia de acuerdo con la correlación de ER frente a AR diagnóstica. Determinando la relación de AR:ER usando métodos descritos en este documento, se puede seleccionar si administrar una quimioterapia antiestrógenos o una quimioterapia antiandrógenos. En general, cualquier método conocido para un experto en la materia para determinar la cantidad relativa o absoluta o valor de ER o AR (por ejemplo, nivel de expresión de ARNm, cantidad de ARNm, métodos de inmunotinción tales como ELISA y transferencia de Western) pueden usarse para determinar la relación de ER y AR presente en el tumor. En una realización particular, se usa inmunotinción para determinar la relación de AR:ER. Usando un método divulgado en este documento, los pacientes que se encontraron que tenían tumores con características que indican que responderán positivamente a tratamiento antiestrógenos se tratan con tratamiento antiestrógenos, y los pacientes con tumores que tienen características que indican que no responderán positivamente a terapia antiestrógenos se tratan con un tratamiento diferente (por ejemplo, un inhibidor antiandrógenos o de la ruta de los andrógenos). Debe apreciarse que si el análisis indica que el tratamiento antiestrógenos es eficaz, se puede administrar una combinación de los tratamientos antiandrógenos y antiestrógenos.

De forma sorprendente e inesperada, el autor de la presente invención ha descubierto que los tumores de cáncer de mama que tienen una correlación positiva entre los receptores de estrógenos y los receptores de andrógenos (es decir, cuando ER es elevado AR es elevado y viceversa) son más sensibles a tratamiento endocrino tradicional o

antiestrógenos (por ejemplo, con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasas) y que los tumores que tienen una correlación positiva o tumores que tienden a tener una correlación inversa en AR y ER no responden a tratamiento antiestrogénicos. Por lo tanto, los tumores que no tienen una correlación positiva entre AR y ER (es decir, que tiene significativamente más AR que ER, por ejemplo, la relación de AR:ER es 1,3 o mayor, típicamente 2 o mayor y a menudo 3 o mayor) son candidatos para el tratamiento con un inhibidor antiandrogénicos o de la ruta de los andrógenos. Como se usa en este documento, la expresión "correlación positiva entre AR y ER" se refiere a la relación de menos de 1,3, típicamente en el intervalo entre 0,5 y 1,3, y a menudo entre 0,7 y 1,3.

En algunas realizaciones, la relación o correlación de ER frente a AR se determinó por inmunotinción para los valores del receptor de estrógenos y del receptor de andrógenos (por ejemplo, porcentaje de células que se tiñen x intensidad de tinción). Como alternativa, la relación de AR:ER puede obtenerse simplemente determinando el porcentaje de células que son positivas para la inmunotinción.

Como se indica anteriormente, los aspectos de la presente invención se basan al menos en parte en el descubrimiento por el autor de la presente invención de que cuando estos valores (por ejemplo, inmunotinción de AR y ER) se representan uno frente al otro en el mismo gráfico, los tumores que respondían a tratamiento antiestrogénicos tienen un valor R como se describe en este documento. En particular, los resultados de este estudio de correlación demostraron que tumores que responden a tratamiento endocrino tradicional (con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasas) tenían una correlación positiva estadísticamente significativa entre ER y AR (es decir, cuando ER es elevado AR tiende a ser elevado y viceversa). Sin embargo, los tumores de pacientes que no respondían a tratamiento endocrino no mostraban la correlación positiva; en su lugar mostraban típicamente una tendencia hacia una correlación inversa con un valor de AR a menudo significativamente mayor que ER, por ejemplo, la relación de AR:ER de 1,3 o mayor, típicamente 2 o mayor y a menudo 3 o mayor.

Objetivos adicionales, ventajas y características novedosas de esta invención llegarán a ser evidentes para los expertos en la materia tras examinar los siguientes ejemplos de la misma, que no pretenden ser limitantes. En los Ejemplos, se describen procedimientos que se redujeron de forma constructiva a la práctica en tiempo presente, y los procedimientos que se han realizado en el laboratorio se exponen en tiempo pasado.

### 30 Ejemplos

#### Métodos

**Cultivo celular.** Todas las líneas celulares usadas en estos estudios se autentificaron por análisis de repetición en tándem individual. Las células BCK4 son una línea celular de cáncer de mama derivada de una efusión pleural. Las células BCK4 y MCF7 se cultivaron en MEM, FBS al 5 %, NEAA, insulina y penicilina/estreptomicina. Las células ZR75 se cultivaron en el mismo medio con la adición de HEPES y L-glutamina. Las células T47D se cultivaron en DMEM complementado con FBS al 10 %, L-glutamina, penicilina/estreptomicina. Las células LNCaP se cultivaron en RPMI, FBS al 5 % y penicilina/estreptomicina. Todas las células se cultivaron en una incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. MDA-MB-453 y MDA-kb2, (un derivado de MDA-MB-453 que expresa de forma estable la construcción del gen indicador de luciferasa-MMTV dependiente de AR, ATCC) se cultivaron en medio L-15 Leibovitz (Invitrogen) que contenía FBS al 10 % (Gibco) y penicilina/estreptomicina. Las células MCF7-TGL se generaron por expresión estable del vector SFG-NES-TGL retroviral, que codifica una fusión triple de timidina cinasa, GFP y luciferasa. Las células que expresan la proteína de fusión se clasificaron para GFP. Las identidades de todas las líneas celulares se confirmaron por perfil de ADN usando el kit Identifier (Applied Biosystems).

**Ensayo de proliferación.** Las células MCF7 o BCK4 (1000 y 10 000 células por pocillo, respectivamente) se sembraron en una placa de 96 pocillos en medio sin rojo de fenol que contenía suero separado con carbón vegetal (CSS). Veinticuatro horas después de la siembra, las células se trataron con un control de vehículo (etanol + DMSO), estradiol 10 nM (E2, Sigma), dihidrotestosterona 10 nM (DHT, Sigma), bicalutamida 1 μM (ChemPacific), enzalutamida 10 μM (Medivation) o combinaciones de los anteriores. Las células se volvieron a tratar en el día 3. La proliferación se evaluó usando un ensayo MTS (según las instrucciones del fabricante, Roche). Todos los valores se presentan como un cambio factorial sobre el día de tratamiento (día 0).

La figura 2 muestra el resultado del ensayo de proliferación inducido por estrógenos. Las células MCF7 se sembraron en medio que contenía CSS al 5 % durante 72 h antes del tratamiento con control de vehículo, E2 10 nM, E2 10 nM + bicalutamida 1 μM, E2 10 nM + Enza 10 μM, E2 10 nM + MJC13 30 μM (véase De Leon et al., PNAS, 2011, 108(29), 11878-11883), o E2 10 nM + ICI 10 nM. Los datos se muestran como cambio factorial sobre el tiempo (A) o en el día 7 (B). Las barras de error representan la desviación típica. Dev., \*p<0,05, \*\*\*p<0,01

**Estudios en tumor.** Se realizaron experimentos de MCF7 con enzalutamida (es decir, MDV3100) suministrada en pienso de roedores. Se realizaron experimentos con MCF7 y MDA-MB-453 en que se suministró enzalutamida por sonda oral. En resumen, se mezclaron 10<sup>6</sup> células MCF7-TGL que expresan de forma estable una fusión triple de timidina cinasa, GLP y luciferasa (vector retroviral SFG-NES-TGL) con fines de imágenes IVIS con Matrigel (BD Biosciences) y se inyectaron en la cuarta almohadilla de grasa mamaria inguinal de ratones hembra, atímicas nu/nu

o no obesas diabéticas (NOD)/SCID (Taconic) ovariectomizadas. En el momento de la inyección del tumor, se implantaron por vía subcutánea (SQ) gránulos E2 (liberación de 60 días, 1,5 mg/gránulo, Innovative Research of America) o DHT (8 mg/gránulo, envasado y precintado en tubo de silastic) en la parte posterior del cuello. La carga tumoral se evaluó usando sistema de imágenes *in vivo* (IVIS) o mediciones con calibre. Una vez se hubieron establecido los tumores, los ratones se emparejaron en grupos basándose en la carga tumoral total medida por IVIS o calibre. Los grupos que recibían tamoxifeno tenían un gránulo (liberación de 90 día, 5 mg/gránulo, Innovative Research of America) implantado SQ. A los ratones se les administró enzalutamida en su pienso (aproximadamente una dosis diaria de 50 mg/kg) o por sonda oral (10 mg/kg/día o 25 mg/kg/día, Medivation Inc). La enzalutamida se mezcló con pienso de ratón molido (n.º de cat. AIN-76, Research Diets Inc; New Brunswick, NJ) a 0,43 mg por gramo de pienso. El alimento se irradió y almacenó a 4 °C antes de su uso. Los ratones en el grupo de control recibieron el mismo pienso de ratón molido pero sin enzalutamida. A todos los ratones se les dio acceso libre a MDV3100 mezclado con pienso o pienso de control durante el periodo completo del estudio y aun promedio de 3,5 g/día de ingesta de alimento. El alimento se cambió en las jaulas de los animales dos veces a la semana. Se preparó agua y alimento *ad libitum*. Dos horas antes del sacrificio, a los ratones se les inyectó IP 50 mg/kg de BrDU (Sigma-Aldrich). Los ratones se sacrificaron por asfixia con CO<sub>2</sub> seguido por dislocación cervical y se recogió la sangre, los tumores, los colonos, los úteros y las glándulas mamarias.

Para el estudio de tumor MDA-453, se inyectaron  $6 \times 10^6$  células en la cuarta almohadilla de grasa mamaria inguinal de ratones hembra NOD-SCID-IL2Rgc<sup>-/-</sup>. Se implantó SQ un gránulo de DHT (liberación de 60 días, Innovative Research of America) en el momento de la inyección celular. Se midió el tamaño del tumor usando calibres y una vez que los tumores alcanzaron 100 mm<sup>3</sup>, los ratones comenzaron a recibir 10 mg/kg de enzalutamida o vehículo por sonda oral. Una vez que los tumores alcanzaron 400 mm<sup>3</sup>, se inició otro grupo con 25 mg/kg de enzalutamida. una vez se sacrificaron los ratones, se pesaron los tumores y se fijaron para el análisis inmunohistoquímico.

Análisis estadístico. La estadística se realizó usando el programa informático Graphpad Prism 5.0 y el programa estadístico SAS (versión 9.1). Para ensayar la correlación entre la tinción de AR y ER, se usó la correlación de Spearman. Cuando se compararon los dos grupos, se usó el ensayo de la t de Student (para datos distribuidos de forma normal) o del orden de Wilcoxon (para datos no distribuidos de forma normal). Se usó un ensayo de la t para datos emparejados o el ensayo del orden con signo de Wilcoxon para comparar los datos emparejados. Para la comparación de múltiples grupos, se usó ANOVA con corrección de ensayo de comparación múltiple Bonferonni (datos distribuidos de forma normal) o el ensayo de Kruskal-Wallis con corrección de ensayo de comparación múltiple de Dunn (datos no distribuidos de forma normal). Para los datos *in vitro* donde los cambios factoriales calculados para cada punto temporal eran mediciones independientes, se usó un ANOVA de efectos fijos bilateral que compara los cambios factoriales medios para diferentes días y grupos de tratamiento. Se ensayó la interacción entre los términos fijos en el modelo. Se realizó un posensayo usando el ensayo de la t de Bonferroni para determinar los grupos que diferían significativamente entre sí. Los ensayos estadísticos eran bilaterales y un valor p de menos de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Estudio de tratamiento endocrino neoadyuvante. Los criterios de inclusión y el diseño del estudio se describen en otra parte (8, 11). En resumen, se incluyeron mujeres con cánceres de mama ER+ en un ensayo clínico en fase II aleatorizado para recibir exemestano en solitario (25 mg al día) o exemestano en combinación con tamoxifeno (20 mg al día) durante cuatro meses antes de la cirugía. Las mujeres incluidas en el ensayo eran posmenopáusicas con cánceres recién diagnosticados de fase II/III, T2-3. Se tomaron biopsias centrales con aguja antes del tratamiento y se tomaron trozos de tumor de la cirugía de escisión final para el análisis. Los criterios para las "que responden" variaron de respuesta mínima a respuesta completa, mientras que las "que no responden" tenían enfermedad estable o progresiva.

Estudio de tamoxifeno. Este estudio incluye un subconjunto de 221 pacientes mujeres diagnosticada con cáncer de mama en el Massachusetts General Hospital (MGH) entre 1977 y 1993, que se trataron con tamoxifeno adyuvante y con un seguimiento en el MGH hasta 1998. Los tumores incluidos en parafina fijados en formalina del archivo en este conjunto de datos se emparejaron basándose en la edad del paciente al diagnóstico, el tamaño del tumor, el grado del tumor y el estado de los nódulos y si el paciente no respondía al tratamiento con tamoxifeno en 60 meses después del tratamiento empezado. Como los datos sobre el tratamiento con tamoxifeno estaban incompletos, los pacientes sin un fracaso registrado en 60 meses del inicio del tratamiento se consideró que no habían fracasado, mientras que aquellos con un fracaso registrado en 60 meses se clasificaron como fracasos. Una vez se completó el emparejamiento, se determinó que algunos de los portaobjetos de tumor incluido en parafina fijado en formalina restantes no eran evaluables para la tinción de AR debido a la edad los portaobjetos de corte (10 casos en total, 5 en cada grupo). Con los casos eliminados, hubo un total de 38 casos restantes en cada grupo para el análisis. Por lo tanto, esto representa una equivalencia parcial y se analizó como un estudio de control de casos.

Se usaron correlaciones de momento de producto de Pearson para describir las asociaciones entre AR y otras variables. Se usaron tablas de contingencia para estudiar las asociaciones entre la relación de AR/ER y las variables clinicopatológicas. En este análisis, cada variable clinicopatológica se dividió en dos o tres categorías (ganglio linfático negativo frente a ganglio linfático positivo; ganglio linfático negativo frente a uno a tres positivos frente a cuatro o más positivos; edad del paciente < 50 frente a ≥ 50 años; tamaño del tumor ≤ 2 cm frente a > 2 cm; grado 1

frente a 2 frente a 3; receptor de progesterona (PgR) negativo frente a positivo; erbB2  $\leq$  30 % frente a  $>$  30 %, MIB-1  $<$  mediana frente a  $\geq$  mediana, mitosis/10 campos de alta energía (MI)  $<$  mediana frente a  $\geq$  mediana, EGFR  $<$  mediana frente a  $\geq$  mediana). La relación AR:ER se calculó usando un análisis de eficacia diagnóstica (ROC) manual donde la relación que producía la mejor diferencia entre un buen pronóstico y un mal pronóstico en relación con la supervivencia sin enfermedad se investigó para identificar el punto de corte para esta variable. Se usó un ensayo exacto de Fisher para todas las variables dicotomizadas y el ji al cuadrado para todas las variables tricotomizadas para comparar la relación AR:ER con otros marcadores predictivos. Las curvas de Kaplan Meier se dibujaron usando la relación AR:ER calculada. Todos los datos estadísticos se calcularon usando StatView (Versión 5.0, SAS Institute, Cary, NC). La significación se determinó a  $p < 0,05$  y todos los ensayos fueron bilaterales.

10

**Imunohistoquímica.** Los portaobjetos se desparafinizaron en una serie de xilenos y etanoles y los antígenos se recuperaron con calor en tampón citrato 10 mM pH 6,0 (BrdU, Ki67) o tampón Tris 10 mM/EDTA 1 mM a pH 9,0 (AR, ER, caspasa 3). Se incubó tejido para BrdU en HCl 2 N seguido por borato de sodio 0,1 M después de la recuperación del antígeno. Los anticuerpos usados fueron: AR clon 441 y ER clon 1D5 (Dakocytomation), caspasa 3 escindida (Cell Signaling Technology), Ki67 (Santa Cruz sc-15402) y BrdU (BD Biosciences). Se usó Envision-HRP (Dakocytomation) para la detección de anticuerpos. Se realizó tinción TUNEL para la apoptosis usando el kit de detección de apoptosis *In Situ* de peroxidasa ApopTag Plus (Millipore), según las instrucciones del fabricante. La tinción de AR y ER se evaluó por un patólogo y el valor se presentó como la intensidad multiplicada por el porcentaje de células positivas o en el caso de la cohorte tratada con tamoxifeno, la curva KM se basa en el porcentaje de células positivas, aunque los resultados son similares y aun significativos cuando la intensidad se multiplica por el porcentaje de positivas. Para la tinción BrdU y TUNEL en estudios de xenoinjerto, se tomaron tres campos 200X diferentes en cada tumor de xenoinjerto usando un microscopio Olympus BX40 (Center Valley, PA) con una cámara y programa informático SPOT Insight Mosaic 4.2 (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI). Se ajustó un umbral de color (RGB para núcleos de tinción positiva, y HSB para los núcleos totales) manualmente usando ImageJ (National Institutes of Health) para cada imagen, y se analizaron las partículas creadas por los umbrales para el área total. El área RGB se dividió por el área HSB y se multiplicó por 100 para cada imagen. Para el análisis del receptor nuclear de andrógenos, la caspasa 3 escindida y Ki67, se exploraron los portaobjetos a 20x en un Aperio Scan Scope XT. El tejido de tumor mamario se rastreó por separado para cada tumor y las áreas necróticas del tumor se retiraron usando una herramienta de pluma negativa en el programa informático Scanscope de Aperio. Se utilizó un algoritmo nuclear para medir el porcentaje de células positivas para los portaobjetos teñidos con Ki-67 y receptor de andrógenos y se exportaron los datos. Los portaobjetos teñidos con caspasa 3 escindida se analizaron usando un algoritmo de recuento de píxeles positivos modificado.

**Imunotransferencia.** Se desnaturalizaron extractos de proteína celular completa (50  $\mu$ g), se separaron en geles SDS PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Después del bloqueo en BSA al 3 % en TBS-T, las membranas se sondearon durante una noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios utilizados incluyen: ER $\alpha$  (Neomarkers Ab-16, dilución 1:500), AR (Upstate PG-21, dilución 1:500 o Santa Cruz N-20, dilución 1:1000), GAPDH (Santa Cruz V-18, dilución 1:1000), Topo 1 (Santa Cruz C-21, dilución 1:1000) y  $\alpha$ -tubulina (clon B-5-1-2 de Sigma, dilución 1:15000). Después de la incubación con el anticuerpo secundario apropiado, se detectaron los resultados usando Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer).

**Fraccionamiento celular.** Para el MDA-MB-453, se realizó análisis de fraccionamiento celular como se describe en Current Protocols in Cell Biology (57). En resumen, se lavaron células MDA-kb2 con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) enfriada en hielo, pH 7,4, se sedimentaron usando centrifugación y se resuspendieron en 2 volúmenes de NSB enfriado en hielo (Tris-Cl 10 mM, pH 7,4, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, inhibidores de la proteasa 1X). El volumen se ajustó con NSB enfriado en hielo hasta 15 veces el volumen inicial y se incubó durante 30 minutos en hielo. La fracción citoplasmática se obtuvo por adición de NP-40 hasta una concentración final de un 0,3 %. Los núcleos y el citoplasma se separaron usando un homogeneizador Dounce de depuración de 0,4 mm. Después de la centrifugación, se recogió el sobrenadante que contenía la fracción citoplasmática. El sedimento que contenía la fracción nuclear se resuspendió en una solución de sacarosa 250 mM que contenía MgCl<sub>2</sub> 10 mM y después se añadió 1 volumen a sacarosa a 880 mM que contenía MgCl<sub>2</sub> 5 mM en la fracción nuclear. Los núcleos después se purificaron por centrifugación a través de un lecho de sacarosa. Para las MCF7, se realizó fraccionamiento celular usando el kit de extracción nuclear y citoplasmática NE-PER, según las instrucciones del fabricante.

55

**Ensayo de translocación nuclear.** Se sembraron células MDA-kb2 a 2 x 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> en microplacas ópticas en medio L-15 de Leibovitz complementado con CSS al 5 %. Después de tres días de cultivo, las células se pretrataron con Enza (1 o 10  $\mu$ M) durante 2 h y después se cotrataron con DHT 1 nM durante 1 h en presencia de Enza (total 3 h de tratamiento con Enza). Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se fijaron con formaldehído al 4 % durante 30 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con triton X-100 al 0,2 %. Las muestras después se bloquearon con BSA al 5 % durante 1 h y se incubaron con un anticuerpo contra AR (AR [N20] Santa Cruz sc-815 1:100) en triton al 0,1 % en PBS durante la noche. La incubación con el anticuerpo secundario anticonejo Alexa Fluor 488 (1:1000) se hizo en BSA al 2,5 % durante 2 h a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI (1  $\mu$ g/ml) durante 30 minutos. Las células se visualizaron con un objetivo 60 X y una cámara digital Qimaging acoplada a un microscopio de fluorescencia Olympus X71 usando un filtro de proteína fluorescente

65

amarilla (YFP) (Chroma U-N31040). La distribución nuclear de AR (relación de señal nuclear de AR/señal total de AR) se cuantificó en un mínimo de 48 células usando el programa informático ImageJ.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR). Se sintetizó ADNc a partir de 1 µg de ARN total, usando la enzima transcriptasa inversa M-Mulv (Promega). Para FASN, PRLR y GCDFP-15, se realizó análisis de expresión génica cuantitativa de SYBR green usando los siguientes cebadores: FASN F 5'-AAGGAC-CTGTCTAGGTTTGATGC-3', FASN R 5'-TGGCTTCAT-AGGTGACTTCCA-3'; PRLR F 5'-TATTCAGTACT-TACCACAGGGA-3', PRLR R 5'-CCCATCTGGTTAGT-GGCATTGA-3'; GCDFP-15 F 5'-TCCCAAGTCAG-TACGT CCAA-3', GCDFP-15 R 5'-CTGTTGGTG-TAAAAGTCCCAG-3'; 18S F 5'-TTGACGGA AG-GGCACCACCAG-3', 18S R 5'-GCACCACCACCACG-GAATCG-3'. Para PR y SDF-1, se realizó PCR en tiempo real taqman usando conjuntos de cebadores/sondas validados de Applied Biosystems (ID de ensayo: PR Hs01556702\_m1, SDF-1 Hs00171022\_m1, 18S Hs99999901\_s1). Se calculó la expresión génica relativa usando el método Ct comparativo y los valores se normalizaron a 18S.

Ensayos de luciferasa. Se sembraron células MDA-kb2 a  $5 \times 10^3$  células/pocillo en placas de luminiscencia de 96 pocillos y se incubaron durante la noche. Las células se trataron con diluciones en serie de factor 10 de Enza (10, 1, 0,1 µM) y DHT (10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 nM) que se prepararon en DMSO. Después de 24 h de incubación, se determinaron los niveles de luminiscencia con el sistema de ensayo de luciferasa (Promega). Se realizaron tres experimentos independientes y se determinaron los valores de luminiscencia como unidades relativas (UR) y se normalizaron al vehículo. Los valores se expresaron como la media de la inducción factorial  $\pm$  el error típico (ET).

Ensayo de unión de radioligando. Los ensayo de unión de radioligando se realizaron por Ricera Biosciences, LLC. Se incubaron ER $\alpha$  o ER $\beta$  con [ $^3$ H] Estradiol 0,5 nM y MDV3100 sin marcar (enzalutamida) a concentraciones que varían de 0,1 µM a 100 µM a 25 °C en tampón de incubación (Tris-HCl 10 mM, BSA al 0,1 %, glicerol al 10 %, DTT 1 mM) durante 2 horas. Los valores de  $Cl_{50}$  y el % de inhibición se determinaron por un análisis de regresión de mínimos cuadrados no lineal usando MathIQTm (ID Business Solutions Ltd., R.U.).

## Resultados

Correlación positiva en tumores sensibles a tratamiento endocrino no adyuvante. La expresión de AR disminuyó en cánceres de mama luminales sensibles a tratamiento AI neoadyuvante, pero se mantuvo en tumores que no logran responder (8). Para determinar si hubo una relación entre la relación de AR a ER y la respuesta clínica, se examinó una cohorte de pacientes tratados con tratamiento AI neoadyuvante. En los tumores sensibles a AI no hubo una correlación positiva fuerte entre la expresión de proteína AR y ER en biopsias previas al tratamiento ( $p=0,006$ , fig. 1A, izquierda). En contraste, en tumores que no lograron responder no hubo correlación significativa entre la expresión de AR y ER ( $p=0,59$ , fig. 1B, izquierda). Las imágenes representativas de tinción de AR y ER en tumores sensibles demuestran cantidades similares de los dos receptores (fig. 1A, derecha), sean bajas (parte superior), medias (parte central) o altas (parte inferior), mientras que los tumores no sensibles tienden a tener niveles mayores de AR que ER (fig. 1B, derecha). Los epitelios normales adyacentes de tumores tanto sensibles como no sensibles también se examinaron y valoraron para AR y ER. La expresión "epitelios normales adyacentes" se refiere a células no tumorales que están adyacentes al sitio del tumor mamario.

El epitelio normal adyacente también contenía una correlación positiva significativa entre los dos receptores ( $p=0,0003$ , fig. 1C, izquierda). Como en los tumores, se mantuvo una correlación sustancial de AR a ER ya sea con expresión baja, media o alta de los receptores (fig. 1C, derecha). La mediana de la relación de la expresión de AR a ER en células epiteliales de mama normales adyacentes fue de 0,94, en tumores sensibles fue de 1,00, mientras que en tumores no sensibles la mediana de la relación AR:ER fue de 3,79 (no mostrada). Por tanto, en general la relación de AR a ER en células epiteliales de mama normales adyacentes de menos de 3, típicamente, menos de 2,5, a menudo menos de 2 y más a menudo menos de 1,5 es indicativa que el cáncer de mama responderá a un tratamiento endocrino. Por tanto, la relación inicial de AR a ER y el mantenimiento de la expresión de AR después de tratamiento endocrino parece ser determinantes de la respuesta al tratamiento endocrino. Como AR también está presente en el núcleo cuando se une al ligando, se cree que la señalización de AR también desempeña una función en la resistencia a tratamientos dirigidos contra ER. Esto se indicó además por la observación de que un nivel de mayor de AR respecto a ER proporcionaba resistencia *de novo* o adquirida a tratamientos endocrinos tradicionales que abordan la ruta de ER. Esta observación también indica que dichos cánceres de mama han cambiado de dependencia de estrógenos a ser dependientes de andrógenos.

Una alta relación AR:ER indica una mala respuesta a tamoxifeno. Para determinar si una alta cantidad de proteína AR en comparación con ER podría predecir el fracaso para tratamientos dirigidos a ER, se examinó una cohorte de pacientes tratados con tamoxifeno con datos de resultado. Este estudio incluyó un subconjunto de 221 pacientes mujeres diagnosticadas con cáncer de mama en el Massachusetts General Hospital (MGH) entre 1977 y 1993, tratadas con tamoxifeno adyuvante y con seguimiento en el MGH hasta 1998. Los pacientes que fracasaron con tamoxifeno y que no fracasaron se emparejaron inicialmente basándose en la edad del paciente al diagnóstico, el tamaño del tumor, el grado del tumor y el estado del nódulo. Sin embargo, algo del tejido de archivo se había degradado y se retiró del análisis (10 casos en total, 5 en cada grupo). Después de emparejar y retirar los casos

subóptimos, permaneció un total de 38 casos en cada grupo para el análisis. Como la selección de muestras fue el resultado de un emparejamiento parcial, el estudio se analizó en gran medida como un estudio de control de casos para determinar las diferencias en las características de los pacientes y los tumores entre fracasos de tratamiento y ausencia de fracaso. Se determinó una relación AR:ER de 1,3 como el punto en que está la mejor separación entre un buen pronóstico y un mal pronóstico. Se realizó un análisis de Kaplan-Meier para examinar las diferencias en las tasas de fracaso mediante el estado de relación AR:ER. El grupo con una mayor relación AR:ER obtuvo una supervivencia sin enfermedad más corta, con un tiempo medio hasta el fracaso de 29 +/-4,3 meses, en comparación con el grupo con AR:ER <1,3 que tuvo un tiempo medio hasta el fracaso de 45 +/- 2,3 meses.

10 Cuando se examina la mediana del tiempo hasta el fracaso (en oposición a la media presentada anteriormente), en tumores con AR:ER  $\geq$  1,3, la mediana del tiempo hasta el fracaso fue de 30 +/- 2 meses, mientras que en tumores con AR:ER < 1,3 la mediana del tiempo hasta el fracaso aún no se alcanzaba a los 120 meses. El número total de pacientes que no fracasaron con el tratamiento con tamoxifeno del conjunto de datos total fue aproximadamente tres veces la cantidad de pacientes que fracasaron, aunque este subconjunto está uniformemente dividido entre fracasos y ausencia de fracaso. La tinción de AR positiva dentro de la cohorte global de pacientes se correlacionó negativamente con el índice mitótico y la expresión de erbB2. Sin embargo, no hubo correlaciones significativas con ninguna de las características del tumor cuando se separaron en grupos de relación AR:ER baja y alta.

Los andrógenos son proliferativos en líneas celulares de cáncer de mama ER+/AR+ y la proliferación mediada por andrógenos puede bloquearse con un inhibidor de la señalización de AR, tal como enzalutamida. Como los datos clínicos mostraron que la señalización de andrógenos desempeña una función en cáncer de mama, se usaron modelos *in vitro* de cáncer de mama para examinar la proliferación mediada por andrógenos. El AR se expresa ampliamente en cánceres de mama luminales (3, 27-29) y se descubrió que en muestras clínicas, un 100 % (35/35) de los tumores de mama luminales expresaban AR mientras que únicamente algunos cánceres de mama triple negativo expresan AR por IHC. Se sondearon lisados de cuatro líneas celulares de cáncer de mama luminal para la expresión de AR y ER. La línea celular de cáncer de próstata LNCaP y la línea celular de cáncer de mama apocrina molecular MDA-MB-453, que expresan altos niveles de AR, se usaron como controles positivos para la expresión de AR (20, 30, 31). El nuevo inhibidor de la señalización del receptor de andrógenos enzalutamida evitó la estabilización mediada por ligando de la proteína AR. Las células MCF7 y la línea celular BCK4 recién obtenida expresaban tanto AR como ER, y ambas líneas celulares proliferaron en respuesta a DHT *in vitro*. Los estudios han demostrado que las células MCF7 expresan un AR de tipo silvestre, aunque con una repetición CAG acortada (32), que a menudo es indicativa de un receptor más activo (33). Para determinar si la proliferación mediada por andrógenos en células de cáncer de mama puede bloquearse por un antiandrógeno, se ensayó la eficacia de enzalutamida. Se bloqueó la proliferación estimulada por DHT por enzalutamida en ambas líneas celulares. Además, el fraccionamiento celular reveló que la enzalutamida inhibía la translocación nuclear mediada por DHT de AR.

Para determinar si la enzalutamida inhibe el crecimiento mediado por andrógenos *in vivo*, se inyectaron células MCF7 que expresan de forma constitutiva luciferasa (MCF7-TGL) en la almohadilla de grasa mamaria de ratones hembra inmunocomprometidas ovariectomizadas a las que se ha implantado un gránulo de DHT. Se midió la carga tumoral total usando imágenes luminiscentes de todo el cuerpo y mediciones con calibre. Una vez se establecieron los tumores, los ratones se emparejaron en dos grupos de tratamiento (día -2) basándose en la carga tumoral medida por luminiscencia, recibiendo uno pienso de control y recibiendo el otro pienso que contiene 50 mg/kg de enzalutamida. Los tumores en los ratones tratados con DHT siguieron creciendo, mientras que los ratones que recibieron DHT + enzalutamida mostraron regresión de los tumores por el sistema de imágenes de luminiscencia *in vivo* (IVIS) y por medición por calibre. En el día final de las imágenes (día 19) los tumores habían sufrido regresión hasta niveles casi indetectables, con una disminución de un 83,2 % en la luminiscencia en ratones que recibieron DHT + enzalutamida en comparación con el grupo de DHT. La proliferación en los tumores tratados con enzalutamida fue un 31,3 % inferior que en tumores tratados con DHT en solitario, determinada por incorporación de BrdU. Además, la tinción TUNEL indicó un aumento de un 50 % en células apoptóticas en los tumores tratados con enzalutamida. Coherente con la enzalutamida que altera la entrada nuclear de AR (25), se observó una disminución drástica (92,5 %) en la localización nuclear de AR en tumores tratados con enzalutamida. Asimismo, en ratones a los que se administró enzalutamida por sonda oral, la carga tumoral disminuyó de una manera dependiente de la dosis.

#### La enzalutamida inhibe el crecimiento mediado por andrógenos en células de cáncer de mama ER- *in vitro* e *in vivo*.

55 Este estudio se diseñó para determinar si la enzalutamida podía bloquear la proliferación inducida por andrógenos de líneas de cáncer de mama AR+ (tanto ER+ como ER-) *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo*. Los datos indican que la enzalutamida no solamente inhibe el crecimiento tumoral mediado por andrógenos de cánceres de mama AR+, independientemente del estado ER, sino que también puede inhibir el crecimiento tumoral estimulado por estrógenos en un modelo preclínico de cáncer de mama ER+/AR+.

60 Similar a los informes previos (3, 34), se observó que la mayoría de los cánceres de mama luminales y aproximadamente un 25 % de los tumores de mama ER- eran positivos para la expresión de AR. Las líneas celulares ER- y los tejidos ER- presentaban un patrón heterogéneo de expresión de AR. Las células MDA-MB-453 representan una línea celular apocrina molecular con altos niveles de AR que contiene una mutación puntual que disminuía la sensibilidad a DHT (35). No obstante, estas células proliferan en respuesta a andrógenos (30, 31) y, por

lo tanto, se realizaron experimentos para determinar si la enzalutamida podría bloquear los efectos mediados por DHT sobre la expresión génica y la proliferación. De hecho, la enzalutamida anuló de forma sustancialmente completa la proliferación inducida por DHT. La expresión de los genes dependientes de andrógeno/AR ácido graso sintasa (FASN), proteína del líquido de la enfermedad quística normal (GCDFP-15) y el receptor de prolactina (PRLR) (31) se redujo por enzalutamida. Además, en una sublínea de células MDA-MB-453 que expresa de forma estable un indicador de luciferasa sensible a andrógeno (MDA-kb2 (36)), la enzalutamida inhibió la activación de la construcción de luciferasa de una manera dependiente de la dosis. La enzalutamida altera la importación nuclear mediada por ligando de AR en células de próstata (25). La señal de AR nuclear a total se cuantificó usando IHC y se realizó fraccionamiento celular. Se descubrió que lo mismo era cierto en células MDA-MB-453.

10

Para determinar si la enzalutamida inhibe el crecimiento tumoral inducido por andrógenos, se cultivaron xenoinjertos MDA-MB-453 en el sitio ortotópico en ratones inmunocomprometidos a los que se ha implantado un gránulo de DHT. Similar a los informes previos (20), DHT estimulaba el crecimiento tumoral. Una vez que los tumores alcanzaron 100 mm<sup>3</sup>, los ratones se trataron con 10 mg/kg/día de enzalutamida o vehículo por sonda oral. Los ratones tratados con enzalutamida mantenían los tumores sustancialmente al mismo tamaño que los ratones que no recibían tratamiento con DHT. Otro grupo de ratones recibió una dosis mayor de enzalutamida (25 mg/kg/día por sonda oral) una que los tumores alcanzaron 400 mm<sup>3</sup>. A esta dosis mayor, hubo una tendencia hacia un tamaño del tumor disminuido. Los pesos de los tumores tratados con la dosis alta o la dosis baja de enzalutamida eran significativamente menores que los de los ratones tratados con DHT, una disminución de un 85,2 % y un 65,0 % respectivamente, que indica que las mediciones con calibre para la alta dosis de enzalutamida subestima la carga tumoral disminuida en este grupo. De forma interesante, no hubo diferencia significativa en la tasa de proliferación de ninguno de los grupos, medida por tinción de Ki67, pero hubo un aumento estadísticamente significativo en la apoptosis en ambos grupos de tratamiento con enzalutamida frente a DHT (aumento de un 60,0 % y un 54,3 % en los grupos de dosis baja y alta respectivamente), medida por la cantidad de caspasa 3 escindida. Esto indicó que en tumores MDA-MB-453, DHT protege a las células contra la apoptosis y la enzalutamida altera este efecto antiapoptótico. Coherente con los datos *in vitro*, la enzalutamida podía atenuar la entrada nuclear mediada por ligando de AR, de modo que hay una disminución significativa (un 50,0 % en el grupo de dosis baja y un 44,3 % en el grupo de dosis alta) en la cantidad de núcleos positivos a AR en los tumores tratados con enzalutamida. Asimismo, cuando se realizó un estudio de xenoinjerto MDA-MB-453 con tratamientos de dosis baja y alta de enzalutamida, ambos iniciados cuando los tumores alcanzaron 100 mm<sup>3</sup>, se disminuyó el crecimiento tumoral de una manera dependiente de la dosis asociada con la tinción de AR nuclear reducida.

La enzalutamida inhibe el crecimiento mediado por estrógenos *in vitro* e *in vivo*. Como E2 es el mitógeno principal en tumores ER+, se realizó un estudio para determinar si la enzalutamida afectaría a la proliferación mediada por E2 en células de cáncer de mama ER+/AR+. Aunque la enzalutamida tiene una unión de alta afinidad por AR, un ensayo de unión de radioligando *in vitro* demostró que la enzalutamida no se unía significativamente a ER $\alpha$  o ER $\beta$ . Sin embargo, la enzalutamida inhibió significativamente la proliferación inducida por E2 tanto de células MCF7 como BCK4 *in vitro*. La enzalutamida también inhibía la regulación por aumento inducida por E2 de PR y el factor 1 derivado de estroma (SDF-1) (también conocido como CXCL12), dos genes sensibles a estrógenos. Para determinar si otros andrógenos también inhiben la proliferación mediada por E2, se ensayó el efecto de bicalutamida sobre la proliferación mediada por E2 *in vitro*. La bicalutamida inhibía la proliferación mediada por DHT en células MCF7, tal como se esperaba, pero en contraste con la enzalutamida, aumentaba significativamente la proliferación mediada por E2. Esta inducción de la acción mediada por E2 también se detectó a nivel de expresión génica, donde la bicalutamida aumentaba la inducción mediada por E2 de ARNm de PR SDF-1.

45

Para determinar si la enzalutamida afecta al crecimiento de tumores de mama mediado por E2 *in vivo*, se realizó un estudio de xenoinjerto con células MCF7-TGL que expresan constitutivamente luciferasa cultivadas en ratones hembra inmunocomprometidas ovariectomizadas a las que se ha implantado un gránulo de E2. Las células se inyectaron de forma ortotópica y una vez que los tumores se establecieron (tamaño promedio de 100 mm<sup>3</sup>), los ratones se emparejaron en tres grupos: 1) pienso de control, 2) pienso de control y un gránulo de tamoxifeno, 3) pienso que contiene 50 mg/kg de enzalutamida. La enzalutamida inhibió significativamente el crecimiento tumoral del xenoinjerto MCF7 mediado por E2 de forma tan eficaz como el tamoxifeno, con una disminución en la luminiscencia en todo el cuerpo de un 59,9 % para el grupo de tamoxifeno y un 70,3 % en el grupo de enzalutamida en el día 11. El día 11 fue el día final de imágenes para el grupo de E2 ya que la luminiscencia estaba próxima de la saturación y los ratones tenían que sacrificarse debido a una gran carga tumoral. Se midió el flujo de luminiscencia para animales individuales y se tomaron imágenes de los ratones para el día de emparejamiento (día -3) y el último día de imágenes cuando todos los ratones estaban vivos (día 11). Se descubrió que ambos fármacos disminuían significativamente la proliferación celular, con una disminución de un 46,4 % en el grupo de E2 + tamoxifeno y una disminución de un 54,2 % en el grupo de E2 + enzalutamida en comparación con el grupo de E2, medida por la incorporación de BrdU. En contraste con lo que se observó en el crecimiento mediado por DHT, la enzalutamida no inducía apoptosis en condiciones de crecimiento estimulado por E2. Estos resultados se recapitulaban en estudios de xenoinjerto en que los ratones se trataron con enzalutamida por sonda oral.

60

## Discusión

Los experimentos descritos en este documento demuestran que tanto en células MCF-7 como en la línea de cáncer de mama recién obtenida de una efusión pleural (BCK4), los andrógenos pueden inducir proliferación de cánceres de mama ER-/AR+, una observación coherente con los informes previos (31, 37-39). Además, los experimentos demostraron que un antagonista de AR, enzalutamida, inhibe el crecimiento inducido por andrógenos de tumores de mama tanto ER+/AR+ como ER-/AR+ *in vivo*. La inmensa mayoría de los cánceres de mama ER+ también son AR+ (84-91 %) (5, 40, 41) y los pacientes con tumores que coexpresan AR con ER y PR tienen una supervivencia sin enfermedad más larga que aquellos cuyos tumores son negativos para los tres receptores (40), probablemente debido a que dichos tumores están mejor diferenciados. Sin embargo, el AR es un predictor independiente de metástasis axilar (41) y se correlaciona con el estado positivo del ganglio linfático (42). Aún hay controversia sobre la manera en que el AR unido al ligando afecta a la proliferación y crecimiento de los cánceres de mama ER+ (43) y si difiere en mujeres premenopáusicas frente a posmenopáusicas cuando la cantidad de estrógenos en circulación difiere, o en mujeres con cáncer de mama que se están tratando con tamoxifeno o AI. Como se divulga en este documento, una relación mayor de proteína AR a ER es indicativa de ausencia de respuesta a tratamiento AI neoadyuvante y también supervivencia sin enfermedad más corta en pacientes tratados con tamoxifeno. Estos hallazgos muestran que la relación AR:ER es un predictor independiente novedoso de respuesta para los tratamientos endocrinos tradicionales dirigidos a la ruta de estrógenos. La presente invención también divulga que los pacientes que recaen mientras están con tamoxifeno o AI son buenos candidatos para tratamiento dirigido a AR.

En contraste con los datos *in vitro* en las células MCF7 y BCK4 ER+/AR+ que proliferan en respuesta a DHT, en algunas líneas celulares de cáncer de mama ER+/AR+, DHT disminuía la proliferación inducida por E2 (30, 44-46). El autor de la presente invención también ha observado que la bicalutamida aumentaba la proliferación mediada por E2, lo que indica que la bicalutamida inhibe la capacidad de AR de disminuir la proliferación mediada por ER. En combinación con el hecho de que AR es predictivo de mejor pronóstico, se aceptó que estos resultados indican que AR es protector contra cáncer de mama estimulado por E2. El autor de la presente invención descubrió que el inhibidor de la señalización de AR, enzalutamida, altera la localización nuclear de AR e inhibe la proliferación mediada por E2 *in vitro* e *in vivo*.

La evidencia de que AR desempeña una función proliferativa en el desarrollo de la glándula mamaria proviene del análisis de ratones hembra que carecen de AR. El desarrollo de la glándula mamaria se retarda en ratones AR<sup>-/-</sup>, con ramificación reducida de los conductos, menos células Cap en las yemas de los extremos terminales, desarrollo lobuloadveolar disminuido y menos alveolos productores de leche en glándulas de lactación. Las glándulas mamarias de ratones AR<sup>-/-</sup> tienen un 50 % menos de proliferación que las glándulas de ratones AR<sup>+/+</sup> en cuatro a seis semanas de edad (47). De forma interesante, las células MCF7 con AR eliminado mostraban una respuesta proliferativa muy alterada a E2 y el crecimiento de estas células se inhibía en medio normal y privado de esteroides (47).

Se cree que las influencias hormonales sobre la mama son bastante diferentes en mujeres premenopáusicas frente a posmenopáusicas. Los datos que sugieren un efecto protector de los andrógenos provienen de experimentos que utilizan andrógenos en presencia de estrógenos, formando un modelo más cercano de esa manera del estado premenopáusico (48). Por tanto, la teoría de que los andrógenos y AR son protectores contra la proliferación mediada por E2 puede ser precisa en mujeres premenopáusicas. El AR puede unirse al cofactor de ER FOXA1 y a elementos de respuesta a estrógenos (ERE), aunque como un activador transcripcional más débil que ER en estos loci. Por lo tanto, el efecto neto del AR unido a un ligando que compite con el ER unido a un ligando puede ser proliferación mediada por E2 disminuida (44). Adicionalmente, en tumores ER-/AR+ tales como la línea celular MDA-MB-453, los eventos de unión AR globales revelan un perfil en gran medida solapante con el de ER en tumores luminales A ER+ (15). En mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama ER+ (que representan la mayoría de los casos) y particularmente en aquellas que se están tratando con AI, los niveles en circulación de E2 son extremadamente bajos, mientras que los niveles de andrógenos en circulación son relativamente altos porque los AI bloquean la conversión de andrógenos en estrógenos (49). De hecho, los niveles en circulación de testosterona, androstenodiona y deshidroepiandrosterona-sulfato (DHEA-S) aumentan en mujeres en tratamiento con AI (50). En este contexto, AR probablemente puede activar las rutas de señalización proliferativas y antiapoptóticas. De hecho, los altos niveles del andrógeno suprarrenal DHEA-S antes del tratamiento son predictivos de fracaso con AI y el DHEA-S en circulación aumenta durante el tratamiento en pacientes con tumores que no logran responder a tratamiento con AI (51).

El autor de la presente invención ha descubierto que la enzalutamida bloquea de forma eficaz la protección mediada por DHT contra la apoptosis tanto en tumores positivos como en tumores negativos a ER. Sin embargo, cuando se opone al crecimiento tumoral estimulado por E2 en células ER+/AR+, la enzalutamida inhibía la proliferación. Aunque la enzalutamida mostró únicamente una afinidad de unión competitiva pequeña por ER, se descubrió que la enzalutamida bloquea la regulación por aumento mediado por E2 de genes regulados por ER clásicos. La quimiocina SDF-1 se induce por E2 y media los efectos mitogénicos de E2 en células de cáncer de mama (52). De hecho, la ruta de SDF-1/CXCR4 activa ER mediante fosforilación de modo que se bloquea la proliferación mediada por E2 por inhibición de esta ruta (53). Sin embargo, que la inhibición de SDF-1 inducida por E2 sea el mecanismo

principal por el que la enzalutamida inhibe la proliferación mediada por E2 no está claro. Otra posibilidad es que AR esté directamente implicado en la proliferación mediada por E2.

En contraste con la enzalutamida, la bicalutamida potenció la regulación por aumento de los genes regulados por E2 y potenció la proliferación celular de cáncer de mama mediada por E2 en ausencia de andrógenos. Esta diferencia en la manera en que la enzalutamida y bicalutamida afectan a la actividad de ER se cree que es un resultado de las diferencias en su mecanismo de acción. Esta diferencia puede proporcionar ideas sobre la función de AR en cáncer de mama. Cuando se une a bicalutamida, el AR se transloca al núcleo y se une a ADN; sin embargo, la transcripción no se activa porque se reclutan correpresores en lugar de coactivadores (54). En contraste, la enzalutamida altera la entrada nuclear de AR (25, 55). Esta observación y el hecho de que la enzalutamida bloquee la proliferación inducida por E2 e inhiba la actividad de ER unido a ligando en los genes regulados por ER clásicos, sugiere que el AR nuclear (y quizá unido a ADN) puede ser crítico para la función de ER. De hecho, se ha informado de que el AR y el ER interactúan directamente (56, 57).

Antes de la presente divulgación, AR no se usaba como biomarcador en cáncer de mama. Sin embargo, como se divulga en este documento, no son las cantidades totales de ER o AR, sino en su lugar la relación la que es un indicador significativo de la biología del tumor. Una alta relación de AR a ER es predictiva de una mala respuesta a tratamiento endocrino. Sin limitarse a teoría alguna, esta mala respuesta se cree que es un resultado de la resistencia *de novo* y/o adquirida a antiestrógenos. Además, una mayor expresión nuclear de AR respecto a ER es indicativa de AR unido a ligando activo, ya que la proteína AR se transloca al núcleo y se estabiliza tras la unión al ligando. La presente divulgación muestra que la proteína AR y ER se expresan a cantidades casi equivalentes en tumores que responden a tratamiento endocrino neoadyuvante y en epitelio no implicado adyacente, lo que indica que niveles de cercanos a iguales de AR y ER reflejan un estado más normal o bien diferenciado. Además de ser un indicador de respuesta a tratamientos dirigidos a ER, altos niveles de AR respecto a ER también indican tumores que se beneficiarían de un tratamiento antiandrógenos tal como enzalutamida.

Aunque el AR se ha considerado una diana terapéutica potencial en cánceres de mama ER-/AR+ (13, 14, 16, 20), no se ha sugerido previamente como una diana en cánceres de mama ER+. Sin embargo, como algunos pacientes con cáncer de mama ER+ finalmente fracasan en tratamientos dirigidos antiestrógenos tradicionales, abordar AR para inhibir el crecimiento tumoral estimulado por andrógenos, o como una manera alternativa/adicional de inhibir el crecimiento mediado por E2, puede ser clínicamente muy útil. Además, una alta relación de AR a ER indica un subconjunto de cánceres de mama que responderían más favorablemente a tratamiento antiestrógenos (por ejemplo, usando enzalutamida) que un tratamiento dirigido antiestrógenos o al menos indica que dichos tumores se benefician de un compuesto antiestrógenos, tal como enzalutamida, tras recaída mientras se está en tratamiento dirigido a ER tradicional. Se observó que incluso en xenoinjertos MCF-7, que expresan más ER que AR, la enzalutamida era tan eficaz como el tamoxifeno en inhibir el crecimiento tumoral. Tomados en conjunto, los datos presentados en este documento apoyan una función para AR en la resistencia a tratamiento endocrino tradicional, particularmente en mujeres posmenopáusicas. Además, los datos divulgados en este documento indican el uso de un compuesto antiandrógenos o antagonista de AR, tal como enzalutamida, para el tratamiento de tumores AR+ independientemente del estado ER, ya que este fármaco tiene la capacidad de bloquear el crecimiento tumoral mediado tanto por andrógenos como por estrógenos.

La discusión anterior de la invención se ha presentado con fines de ilustración y descripción. Lo anterior no pretende limitar la invención a la forma o forma divulgadas en este documento. El alcance de protección se define por las reivindicaciones adjuntas.

#### Referencias

1. Guedj, M., Marisa, L., de Reynies, A., Orsetti, B., Schiappa, R., Bibeau, F., Macgrogan, G., Lerebours, F., Finetti, P., Longy, M., *et al.* 2011. A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene*.
2. Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y. y Pietenpol, J.A. 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121.
3. Collins, L.C., Cole, K.S., Marotti, J.D., Hu, R., Schnitt, S.J. y Tamimi, R.M. 2011. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Mod Pathol* 24:924-931.
4. Park, S., Koo, J., Park, H.S., Kim, J.H., Choi, S.Y., Lee, J.H., Park, B.W. y Lee, K.S. 2010. Expression of androgen receptors in primary breast cancer. *Ann Oncol* 21:488-492.
5. Hu, R., Dawood, S., Holmes, M.D., Collins, L.C., Schnitt, S.J., Cole, K., Marotti, J.D., Hankinson, S.E., Colditz, G.A. y Tamimi, R.M. 2011. Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women. *Clin Cancer Res* 17:1867-1874.
6. Bergh, J., Jonsson, P.E., Lidbrink, E.K., Trudeau, M., Eiermann, W., Brattstrom, D., Lindemann, J.P., Wiklund, F. y Henriksson, R. 2012. FACT: An Open-Label Randomized Phase III Study of Fulvestrant and Anastrozole in Combination Compared With Anastrozole Alone as First-Line Therapy for Patients With Receptor-Positive Postmenopausal Breast Cancer. *J Clin Oncol*.

7. Mouridsen, H., Gershanovich, M., Sun, Y., Perez-Carrion, R., Boni, C., Monnier, A., Apffelstaedt, J., Smith, R., Sleeboom, H.P., Jaenicke, F., *et al.* 2003. Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol* 21:2101-2109.
- 5 8. Harvell, D.M., Richer, J.K., Singh, M., Spoelstra, N., Finlayson, C., Borges, V.F., Elias, A.D. y Horwitz, K.B. 2008. Estrogen regulated gene expression in response to neoadjuvant endocrine therapy of breast cancers: tamoxifen agonist effects dominate in the presence of an aromatase inhibitor. *Breast Cancer Res Treat.*
9. Harvell, D.M., Spoelstra, N.S., Singh, M., Mc-Manaman, J.L., Finlayson, C., Phang, T., Trapp, S., Hunter, L., Dye, W.W., Borges, V.F., *et al.* 2008. Molecular signatures of neoadjuvant endocrine therapy for breast cancer: characteristics of response or intrinsic resistance. *Breast Cancer Res Treat.*
- 10 10. De Amicis, F., Thirugnansampanthan, J., Cui, Y., Selever, J., Beyer, A., Parra, I., Weigel, N.L., Herynk, M.H., Tsimelzon, A., Lewis, M.T., *et al.* 2010. Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 121:1-11.
11. Niemeier, L.A., Dabbs, D.J., Beriwal, S., Striebel, J.M. y Bhargava, R. 2010. Androgen receptor in breast cancer: expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation. *Mod Pathol* 23:205-212.
- 15 12. Tsutsumi, Y. 2012. Apocrine Carcinoma as Triple-negative Breast Cancer: Novel Definition of Apocrine-type Carcinoma as Estrogen/Progesterone Receptor-negative and Androgen Receptor-positive Invasive Ductal Carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 42:375-386.
- 20 13. Doane, A.S., Danso, M., Lal, P., Donaton, M., Zhang, L., Hudis, C. y Gerald, W.L. 2006. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene* 25:3994-4008.
14. Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., Macgrogan, G., Bergh, J., Cameron, D., Goldstein, D., *et al.* 2005. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 24:4660-4671.
- 25 15. Robinson, J.L., Macarthur, S., Ross-Innes, C.S., Tilley, W.D., Neal, DE, Mills, I.G. y Carroll, J.S. 2011. Androgen receptor driven transcription in molecular apocrine breast cancer is mediated by FoxA1. *Embo J* 30:3019-3027.
16. Lehmann, B.D., Bauer, JA, Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y. y Pietsenpol, J.A. 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121:2750-2767.
- 30 17. Garay, J.P., Karakas, B., Abukhdeir, A.M., Cosgrove, D.P., Gustin, J.P., Higgins, M.J., Konishi, H., Konishi, Y., Luring, J., Mohseni, M., *et al.* 2012. The growth response to androgen receptor signaling in ERalpha-negative human breast cells is dependent on p21 and mediated by MAPK activation. *Breast Cancer Res* 14: R27.
- 35 18. Gucaip, A. y Traina, T.A. 2010. Triple-negative breast cancer: role of the androgen receptor. *Cancer J* 16:62-65.
19. Naderi, A., Chia, K.M. y Liu, J. 2011. Synergy between inhibitors of androgen receptor and MEK has therapeutic implications in estrogen receptornegative breast cancer. *Breast Cancer Res* 13: R36.
20. Ni, M., Chen, Y., Lim, E., Wimberly, H., Bailey, S.T., Imai, Y., Rimm, D.L., Liu, X.S. y Brown, M. 2011. Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Cell* 20:119-131.
- 40 21. Clegg, N.J., Wongvipat, J., Joseph, J.D., Tran, C., Ouk, S., Dilhas, A., Chen, Y., Grillot, K., Bischoff, E.D., Cai, L., *et al.* 2012. ARN-509: a novel antiandrogen for prostate cancer treatment. *Cancer Res* 72:1494-1503.
22. Pal, S.K., Twardowski, P. y Josephson, D.Y. 2009. Beyond castration and chemotherapy: novel approaches to targeting androgen-driven pathways. *Maturitas* 64:61-66.
- 45 23. Scher, H.I., Buchanan, G., Gerald, W., Butler, L.M. y Tilley, W.D. 2004. Targeting the androgen receptor: improving outcomes for castration-resistant prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 11:459-476.
24. Scher, H.I., Halabi, S., Tannock, I., Morris, M., Sternberg, C.N., Carducci, M.A., Eisenberger, M.A., Higano, C., Bubley, G.J., Dreicer, R., *et al.* 2008. Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. *J Clin Oncol* 26:1148-1159.
- 50 25. Tran, C., Ouk, S., Clegg, N.J., Chen, Y., Watson, P.A., Arora, V., Wongvipat, J., Smith-Jones, P.M., Yoo, D., Kwon, A., *et al.* 2009. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science* 324:787-790.
26. Scher, H.I., Fizazi, F., Saad, M.E., Taplin, C.N., Sternberg, K., Miller, R., De Wit, P., Mulers, M., Hirmand, B., Selby, J.S., *et al.* 2012. MDV3100 Improves Overall Survival in Men with Prostate Cancer Post-Docetaxel Results from the Phase 3 AFFIRM Study. *J Clin Oncol* 30.
- 55 27. Castellano, I., Allia, E., Accortanzo, V., Vandone, A.M., Chiusa, L., Arisio, R., Durando, A., Donadio, M., Bussolati, G., Coates, A.S., *et al.* 2010. Androgen receptor expression is a significant prognostic factor in estrogen receptor positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 124:607-617.
- 60 28. Yu, Q., Niu, Y., Liu, N., Zhang, J.Z., Liu, T.J., Zhang, R. J., Wang, S.L., Ding, X.M. y Xiao, X.Q. 2011. Expression of androgen receptor in breast cancer and its significance as a prognostic factor. *Ann Oncol* 22:1288-1294.
29. Ogawa, Y., Hai, E., Matsumoto, K., Ikeda, K., Tokunaga, S., Nagahara, H., Sakurai, K., Inoue, T. y Nishiguchi, Y. 2008. Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological factors and biomarkers. *Int J Clin Oncol* 13:431-435.
- 65

30. Birrell, S.N., Bentel, J.M., Hickey, T.E., Ricciardelli, C., Weger, M.A., Horsfall, D.J. y Tilley, W.D. 1995. Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52:459-467.
- 5 31. Hall, R.E., Birrell, S.N., Tilley, W.D. y Sutherland, R.L. 1994. MDA-MB-453, an androgen-responsive human breast carcinoma cell line with high level androgen receptor expression. *Eur J Cancer* 30A: 484-490.
32. Magklara, A., Brown, T.J. y Diamandis, E.P. 2002. Characterization of androgen receptor and nuclear receptor co-regulator expression in human breast cancer cell lines exhibiting differential regulation of kallikreins 2 and 3. *Int J Cancer* 100:507-514.
- 10 33. Chamberlain, N.L., Driver, E.D. y Miesfeld, R.L. 1994. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 22:3181-3186.
34. Subik, K., Lee, J.F., Baxter, L., Strzepak, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, MC, Bonfiglio, T., Hicks, D.G., *et al.* 2010. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl)* 4:35-41.
- 15 35. Moore, N.L., Buchanan, G., Harris, J., Selth, L.A., Bianco-Miotto, T., Hanson, AR, Birrell, S., Butler, L.M., Hickey, T. y Tilley, W.D. 2012. An androgen receptor mutation in the MDA-MB-453 cell line model of molecular apocrine breast cancer compromises receptor activity. *Endocr Relat Cancer*.
36. Wilson, V.S., Bobseine, K., Lambright, C.R. y Gray, L.E., Jr. 2002. A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid- responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicol Sci* 66:69-81.
- 20 37. Sikora, M.J., Cordero, K.E., Larios, J.M., Johnson, M.D., Lippman, M.E. y Rae, J.M. 2009. The androgen metabolite 5alpha-androstane-3beta, 17beta-diol (3betaAdiol) induces breast cancer growth via estrogen receptor: implications for aromatase inhibitor resistance. *Breast Cancer Res Treat* 115:289-296.
38. Szelei, J., Jimenez, J., Soto, A.M., Luizzi, M.F. y Sonnenschein, C. 1997. Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor. *Endocrinology* 138:1406-1412.
- 25 39. Lin, H.Y., Sun, M., Lin, C., Tang, H.Y., London, D., Shih, A., Davis, F.B. y Davis, P.J. 2009. Androgen-induced human breast cancer cell proliferation is mediated by discrete mechanisms in estrogen receptor-alpha-positive and -negative breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113:182-188.
40. Kuenen-Boumeester, V., Van der Kwast, T.H., Claassen, C.C., Look, M.P., Liem, G.S., Klijn, J.G. y Henzen-Logmans, S.C. 1996. The clinical significance of androgen receptors in breast cancer and their relation to histological and cell biological parameters. *Eur J Cancer* 32A: 1560-1565.
41. Soreide, JA, Lea, O.A., Varhaug, J.E., Skarstein, A. y Kvinnsland, S. 1992. Androgen receptors in operable breast cancer: relation to other steroid hormone receptors, correlations to prognostic factors and predictive value for effect of adjuvant tamoxifen treatment. *Eur J Surg Oncol* 18:112-118.
- 35 42. Agoff, S.N., Swanson, P.E., Linden, H., Hawes, S.E. y Lawton, T.J. 2003. Androgen receptor expression in estrogen receptor-negative breast cancer. Immunohistochemical, clinical, and prognostic associations. *Am J Clin Pathol* 120:725-731.
43. Hickey, T.E., Robinson, J.L., Carroll, J.S. y Tilley, W.D. 2012. Minireview: The Androgen Receptor in Breast Tissues: Growth Inhibitor, Tumor Suppressor, Oncogene? *MolEndocrinol*.
- 40 44. Peters, A.A., Buchanan, G., Ricciardelli, C., Bianco-Miotto, T., Centenera, M.M., Harris, J.M., Jindal, S., Segara, D., Jia, L., Moore, N.L., *et al.* 2009. Androgen receptor inhibits estrogen receptor-alpha activity and is prognostic in breast cancer. *Cancer Res* 69:6131-6140.
- 45 45. Poulin, R., Baker, D. y Labrie, F. 1988. Androgens inhibit basal and estrogen-induced cell proliferation in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Breast Cancer Res Treat* 12:213-225.
46. Macedo, L.F., Guo, Z., Tilghman, S.L., Sabnis, G.J., Qiu, Y. y Brodie, A. 2006. Role of androgens on MCF-7 breast cancer cell growth and on the inhibitory effect of letrozole. *Cancer Res* 66:7775-7782.
47. Yeh, S., Hu, Y.C., Wang, P.H., Xie, C., Xu, Q., Tsai, M.Y., Dong, Z., Wang, R.S., Lee, T.H. y Chang, C. 2003. Abnormal mammary gland development and growth retardation in female mice and MCF7 breast cancer cells lacking androgen receptor. *J Exp Med* 198:1899-1908.
- 50 48. Cops, E.J., Bianco-Miotto, T., Moore, N.L., Clarke, C.L., Birrell, S.N., Butler, L.M. y Tilley, W.D. 2008. Antiproliferative actions of the synthetic androgen, mibolerone, in breast cancer cells are mediated by both androgen and progesterone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110:236-243.
49. Dimitrakakis, C. y Bondy, C. 2009. Androgens and the breast. *Breast Cancer Res* 11:212.
- 55 50. Gallicchio, L., Macdonald, R., Wood, B., Rushovich, E. y Helzlsouer, K.J. 2011. Androgens and musculoskeletal symptoms among breast cancer patients on aromatase inhibitor therapy. *Breast Cancer Res Treat*.
51. Morris, K.T., Toth-Fejel, S., Schmidt, J., Fletcher, W.S. y Pommier, R.F. 2001. High dehydroepiandrosterone-sulfate predicts breast cancer progression during new aromatase inhibitor therapy and stimulates breast cancer cell growth in tissue culture: a renewed role for adrenalectomy. *Surgery* 130:947-953.
- 60 52. Hall, J.M. y Korach, K.S. 2003. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 17:792-803.
53. Sauve, K., Lepage, J., Sanchez, M., Heveker, N. y Tremblay, A. 2009. Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer Res* 69:5793-5800.
54. Masiello, D., Cheng, S., Bubley, G.J., Lu, M.L. y Balk, S.P. 2002. Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor. *J Biol Chem* 277:26321-26326.
- 65

55. Kang, Z., Janne, O.A. y Palvimo, J.J. 2004. Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 18:2633-2648.
56. Panet-Raymond, V., Gottlieb, B., Beitel, L.K., Pinsky, L. y Trifiro, M.A. 2000. Interactions between androgen and estrogen receptors and the effects on their transactivational properties. *Mol Cell Endocrinol* 167:139-150.
57. Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., Nanayakkara, M., Lombardi, M., de Falco, A., Bilancio, A., Varricchio, L., Ciociola, A. y Auricchio, F. 2005. Steroid receptor regulation of epidermal growth factor signaling through Src in breast and prostate cancer cells: steroid antagonist action. *Cancer Res* 65:10585-10593.
58. Park Seho; Park Hyung Seok; Koo Ja Seung; Yang Woo Ick; Kim Seung Il; Park Byeong-Woo 2012. Higher expression of androgen receptor is a significant predictor for better endocrine-responsiveness in estrogen receptor-positive breast cancers. *Breast cancer research and treatment* 133(1): 311-320

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Los regentes de la Universidad de Colorado, una persona jurídica Mouchantat, Jennifer R

<120> Método para determinar el tratamiento de cáncer de mama

<130> CU-008010PC

20 <150> 61/692.331

<151> 23-08-2012

<160>8

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador directo de PCR de FASN

35 <400> 1

aaggacctgt ctaggtttga tgc 23

<210>2

<211> 21

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de PCR de FASN

45

<400> 2

tggctcata ggtgacttc a 21

<210>3

50 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Cebador directo de PCR de PRLR

<400> 3

tattcactga ctaccacag gga 23

60 <210>4

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

# ES 2 696 202 T3

<223> Cebador inverso de PCR de PRLR

<400> 4  
5 cccatctggt tagtgccatt ga 22

<210>5  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Cebador directo de PCR de GCDFP-15

<400> 5  
15 tccaagtca gtacgtccaa a 21

<210>6  
<211> 21  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de PCR de GCDFP-15

25 <400> 6  
ctgttggtg aaaagtccea g 21

<210>7  
<211>21  
30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de PCR de 18S

35 <400>7  
ttgacggaag ggcaccacca g 21

<210>8  
40 <211>21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Cebador inverso de PCR de 18S

<400> 8  
gcaccaccac ccacggaatc g 21

50

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para predecir la probabilidad de un paciente con cáncer de mama de responder positivamente a un tratamiento endocrino, comprendiendo el método:
- 5 determinar la relación entre el receptor de andrógenos (AR) y el receptor de estrógenos (ER) presente en una muestra tisular del paciente;  
en el que, si la relación entre AR y ER en la muestra tisular es menor de 1,3, es probable que el paciente tenga una respuesta positiva a un tratamiento endocrino antiestrógenos; y  
10 en el que, si la relación entre AR y ER en la muestra tisular es mayor de 1,3, es probable que el paciente tenga una respuesta positiva a un tratamiento endocrino antiandrógenos.
2. El método de la reivindicación 1, en el que, si la relación entre AR y ER varía de 0,45 a 0,85, es probable que el paciente tenga una respuesta positiva a un tratamiento endocrino antiestrógenos.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que, si la relación entre AR y ER varía de 0,55 a 0,75, es probable que el paciente tenga una respuesta positiva a un tratamiento endocrino antiestrógenos.
4. Un método para seleccionar un agente quimioterapéutico para tratar el cáncer de mama en un sujeto que necesita dicho tratamiento, comprendiendo dicho método:
- 20 determinar la relación entre el receptor de andrógenos (AR) y el receptor de estrógenos (ER) presente en una muestra tisular del sujeto; y  
seleccionar un modulador de ER para tratar al sujeto cuando la relación entre AR y ER en la muestra tisular es inferior a 1,3 o seleccionar un modulador de AR para tratar al sujeto cuando la relación entre AR y ER en la muestra tisular es mayor de 1,3.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en el que el modulador de AR comprende un inhibidor de AR o inhibidor de la síntesis de andrógenos.
- 30 6. El método de la reivindicación 4, en el que el modulador de ER se selecciona cuando la relación de AR a ER varía de 0,5 a 1,0.
7. El método de la reivindicación 4, en el que el modular de ER comprende tamoxifeno, un inhibidor de aromatasa o una combinación de los mismos.
- 35 8. El método de la reivindicación 1 ó 4, en el que la muestra tisular se selecciona del grupo que consiste en: tejido de cáncer de mama, célula del epitelio adyacente o una combinación de los mismos.
- 40 9. El método de la reivindicación 1 ó 4, en el que dicha etapa de determinación de la cantidad de AR y ER en la muestra tisular comprende inmunotefir la muestra tisular.
10. El método de la reivindicación 9, en el que dicha etapa de determinación de la relación entre AR y ER en la muestra tisular comprende determinar el porcentaje de células teñidas por inmunotinción.
- 45 11. El método de la reivindicación 10, en el que dicha etapa de determinación de la relación de AR y ER en la muestra tisular comprende además determinar la intensidad de tinción de las células teñidas por inmunotinción.

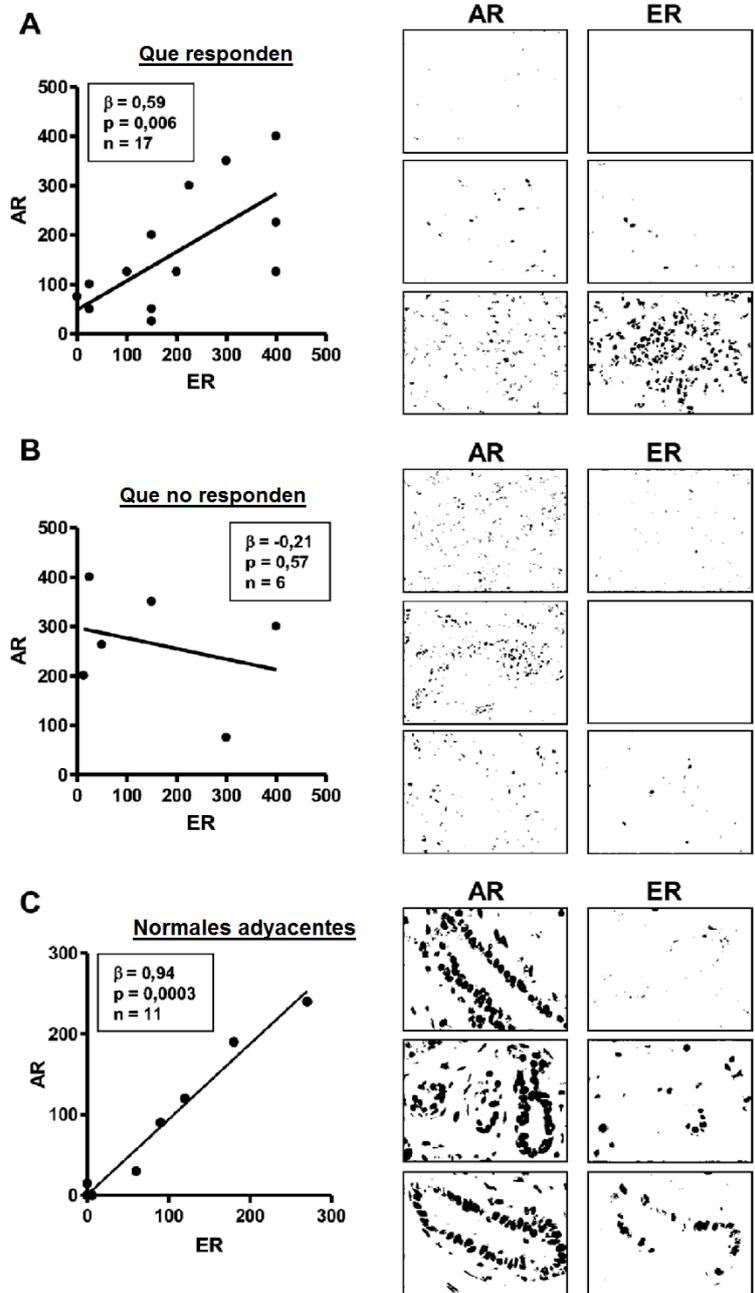


Figura 2

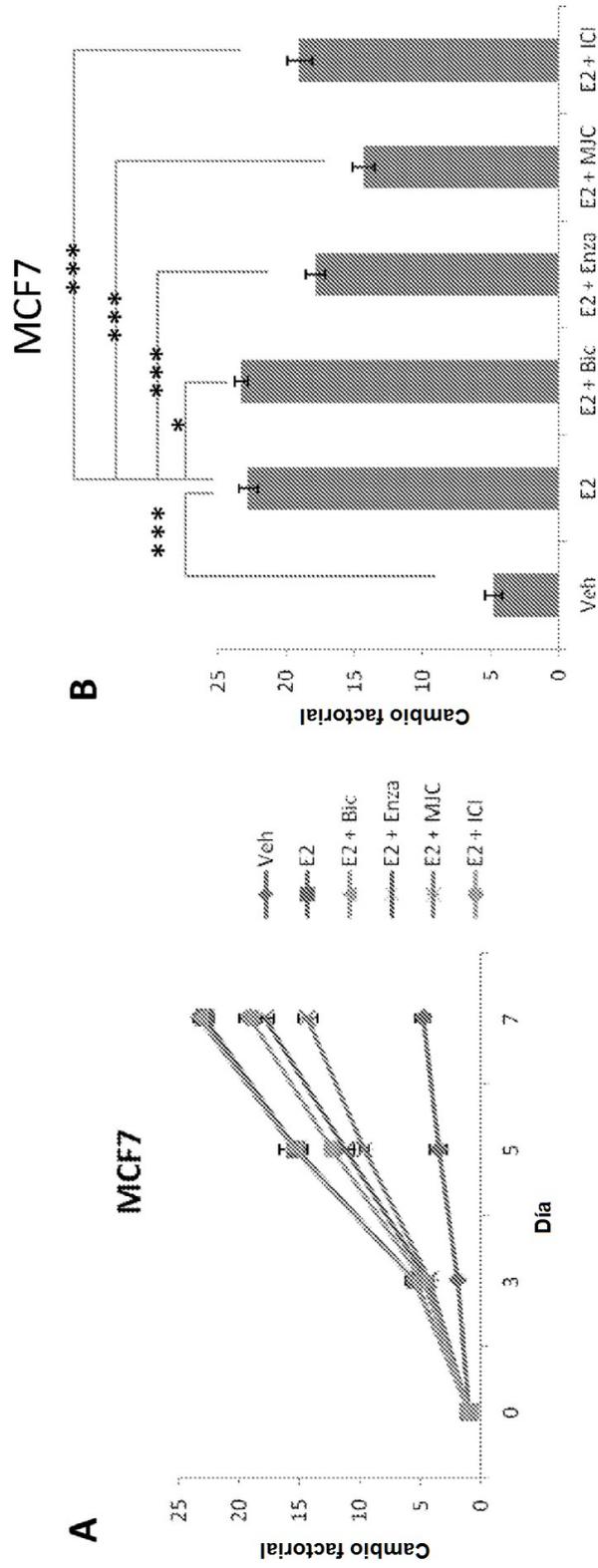


Figura 2

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

### Documentos de patentes citados en la descripción

- US 61692331 A [0001]
- WO 61692331 A [0064]

### Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- DE LEON et al. *PNAS*, 2011, vol. 108 (29), 11878-11883 [0029]
- GUEDJ, M.; MARISA, L.; DE REYNIES, A.; ORSETTI, B.; SCHIAPPA, R.; BIBEAU, F.; MACGROGAN, G.; LEREBOURS, F.; FINETTI, P.; LONGY, M. et al. A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene*, 2011 [0063]
- LEHMANN, B.D.; BAUER, J.A.; CHEN, X.; SANDERS, M.E.; CHAKRAVARTHY, A.B.; SHYR, Y.; PIETENPOL, J.A. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, 2011, 121 [0063]
- COLLINS, L.C.; COLE, K.S.; MAROTTI, J.D.; HU, R.; SCHNITT, S.J.; TAMIMI, R.M. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Mod Pathol*, 2011, vol. 24, 924-931 [0063]
- PARK, S.; KOO, J.; PARK, H.S.; KIM, J.H.; CHOI, S.Y.; LEE, J.H.; PARK, B.W.; LEE, K.S. Expression of androgen receptors in primary breast cancer. *Ann Oncol*, 2010, vol. 21, 488-492 [0063]
- HU, R.; DAWOOD, S.; HOLMES, M.D.; COLLINS, L.C.; SCHNITT, S.J.; COLE, K.; MAROTTI, J.D.; HANKINSON, S.E.; COLDITZ, G.A.; TAMIMI, R.M. Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women. *Clin Cancer Res*, 2011, vol. 17, 1867-1874 [0063]
- BERGH, J.; JONSSON, P.E.; LIDBRINK, E.K.; TRUDEAU, M.; EIERMANN, W.; BRATTSTROM, D.; LINDEMANN, J.P.; WIKLUND, F.; HENRIKSSON, R. FACT: An Open-Label Randomized Phase III Study of Fulvestrant and Anastrozole in Combination Compared With Anastrozole Alone as First-Line Therapy for Patients With Receptor-Positive Postmenopausal Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 2012 [0063]
- MOURIDSEN, H.; GERSHANOVICH, M.; SUN, Y.; PEREZ-CARRION, R.; BONI, C.; MONNIER, A.; APFFELSTAEDT, J.; SMITH, R.; SLEEBOOM, H.P.; JAENICKE, F. et al. Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol*, 2003, vol. 21, 2101-2109 [0063]
- HARVELL, D.M.; RICHER, J.K.; SINGH, M.; SPOELSTRA, N.; FINLAYSON, C.; BORGES, V.F.; ELIAS, A.D.; HORWITZ, K.B. Estrogen regulated gene expression in response to neoadjuvant endocrine therapy of breast cancers: tamoxifen agonist effects dominate in the presence of an aromatase inhibitor. *Breast Cancer Res Treat*, 2008 [0063]
- HARVELL, D.M.; SPOELSTRA, N.S.; SINGH, M.; MCMANAMAN, J.L.; FINLAYSON, C.; PHANG, T.; TRAPP, S.; HUNTER, L.; DYE, W.W.; BORGES, V.F. et al. Molecular signatures of neoadjuvant endocrine therapy for breast cancer: characteristics of response or intrinsic resistance. *Breast Cancer Res Treat*, 2008 [0063]
- DE AMICIS, F.; THIRUGNANSAMPANTHAN, J.; CUI, Y.; SELEVER, J.; BEYER, A.; PARRA, I.; WEIGEL, N.L.; HERYNK, M.H.; TSMELZON, A.; LEWIS, M.T. et al. Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, vol. 121, 1-11 [0063]
- NIEMEIER, L.A.; DABBS, D.J.; BERIWAL, S.; STRIEBEL, J.M.; BHARGAVA, R. Androgen receptor in breast cancer: expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation. *Mod Pathol*, 2010, vol. 23, 205-212 [0063]
- TSUTSUMI, Y. Apocrine Carcinoma as Triple-negative Breast Cancer: Novel Definition of Apocrine-type Carcinoma as Estrogen/Progesterone Receptor-negative and Androgen Receptor-positive Invasive Ductal Carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*, 2012, vol. 42, 375-386 [0063]
- DOANE, A.S.; DANSO, M.; LAL, P.; DONATON, M.; ZHANG, L.; HUDIS, C.; GERALD, W.L. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene*, 2006, vol. 25, 3994-4008 [0063]
- FARMER, P.; BONNEFOI, H.; BECETTE, V.; TUBIANA-HULIN, M.; FUMOLEAU, P.; LARSIMONT, D.; MACGROGAN, G.; BERGH, J.; CAMERON, D.; GOLDSTEIN, D. et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*, 2005, vol. 24, 4660-4671 [0063]
- ROBINSON, J.L.; MACARTHUR, S.; ROSS-INNES, C.S.; TILLEY, W.D.; NEAL, D.E.; MILLS, I.G.; CARROLL, J.S. Androgen receptor driven transcription in molecular apocrine breast cancer is mediated by FoxA1. *Embo J*, 2011, vol. 30, 3019-3027 [0063]
- LEHMANN, B.D.; BAUER, J.A.; CHEN, X.; SANDERS, M.E.; CHAKRAVARTHY, A.B.; SHYR, Y.; PIETENPOL, J.A. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, 2011, vol. 121, 2750-2767 [0063]

- **GARAY, J.P.; KARAKAS, B.; ABUKHDEIR, A.M.; COSGROVE, D.P.; GUSTIN, J.P.; HIGGINS, M.J.; KONISHI, H.; KONISHI, Y.; LAURING, J.; MOHSENI, M. et al.** The growth response to androgen receptor signaling in ERalpha-negative human breast cells is dependent on p21 and mediated by MAPK activation. *Breast Cancer Res*, 2012, vol. 14, R27 [0063]
- **GUCALP, A.; TRAINA, T.A.** Triple-negative breast cancer: role of the androgen receptor. *Cancer J*, 2010, vol. 16, 62-65 [0063]
- **NADERI, A.; CHIA, K.M.; LIU, J.** Synergy between inhibitors of androgen receptor and MEK has therapeutic implications in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2011, vol. 13, R36 [0063]
- **NI, M.; CHEN, Y.; LIM, E.; WIMBERLY, H.; BAILEY, S.T.; IMAI, Y.; RIMM, D.L.; LIU, X.S.; BROWN, M.** Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Cell*, 2011, vol. 20, 119-131 [0063]
- **CLEGG, N.J.; WONGVIPAT, J.; JOSEPH, J.D.; TRAN, C.; OUK, S.; DILHAS, A.; CHEN, Y.; GRILLOT, K.; BISCHOFF, E.D.; CDI, L. et al.** ARN-509: a novel antiandrogen for prostate cancer treatment. *Cancer Res*, 2012, vol. 72, 1494-1503 [0063]
- **PAL, S.K.; TWARDOWSKI, P.; JOSEPHSON, D.Y.** Beyond castration and chemotherapy: novel approaches to targeting androgen-driven pathways. *Maturitas*, 2009, vol. 64, 61-66 [0063]
- **SCHER, H.I.; BUCHANAN, G.; GERALD, W.; BUTLER, L.M.; TILLEY, W.D.** Targeting the androgen receptor: improving outcomes for castration-resistant prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2004, vol. 11, 459-476 [0063]
- **SCHER, H.I.; HALABI, S.; TANNOCK, I.; MORRIS, M.; STERNBERG, C.N.; CARDUCCI, M.A.; EISENBERGER, M.A.; HIGANO, C.; BUBLEY, G.J.; DREICER, R. et al.** Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. *J Clin Oncol*, 2008, vol. 26, 1148-1159 [0063]
- **TRAN, C.; OUK, S.; CLEGG, N.J.; CHEN, Y.; WATSON, P.A.; ARORA, V.; WONGVIPAT, J.; SMITH-JONES, P.M.; YOO, D.; KWON, A. et al.** Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*, 2009, vol. 324, 787-790 [0063]
- **SCHER, H.I.; FIZAZI, F.; SAAD, M.E.; TAPLIN, C.N.; STERNBERG, K.; MILLER, R.; DE WIT, P.; MULERS, M.; HIRMAND, B.; SELBY, J.S. et al.** MDV3100 Improves Overall Survival in Men with Prostate Cancer Post-Docetaxel Results from the Phase 3 AFFIRM Study. *J Clin Oncol*, 2012, 30 [0063]
- **CASTELLANO, I.; ALLIA, E.; ACCORTANZO, V.; VANDONE, A.M.; CHIUSA, L.; ARISIO, R.; DURANDO, A.; DONADIO, M.; BUSSOLATI, G.; COATES, A.S. et al.** Androgen receptor expression is a significant prognostic factor in estrogen receptor positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, vol. 124, 607-617 [0063]
- **YU, Q.; NIU, Y.; LIU, N.; ZHANG, J.Z.; LIU, T.J.; ZHANG, R.J.; WANG, S.L.; DING, X.M.; XIAO, X.Q.** Expression of androgen receptor in breast cancer and its significance as a prognostic factor. *Ann Oncol*, 2011, vol. 22, 1288-1294 [0063]
- **OGAWA, Y.; HAI, E.; MATSUMOTO, K.; IKEDA, K.; TOKUNAGA, S.; NAGAHARA, H.; SAKURAI, K.; INOUE, T.; NISHIGUCHI, Y.** Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological factors and biomarkers. *Int J Clin Oncol*, 2008, vol. 13, 431-435 [0063]
- **BIRRELL, S.N.; BENTEL, J.M.; HICKEY, T.E.; RICCIARDELLI, C.; WEGER, M.A.; HORSFALL, D.J.; TILLEY, W.D.** Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1995, vol. 52, 459-467 [0063]
- **HALL, R.E.; BIRRELL, S.N.; TILLEY, W.D.; SUTHERLAND, R.L.** MDA-MB-453, an androgen-responsive human breast carcinoma cell line with high level androgen receptor expression. *Eur J Cancer*, 1994, vol. 30A, 484-490 [0063]
- **MAGKLARA, A.; BROWN, T.J.; DIAMANDIS, E.P.** Characterization of androgen receptor and nuclear receptor co-regulator expression in human breast cancer cell lines exhibiting differential regulation of kallikreins 2 and 3. *Int J Cancer*, 2002, vol. 100, 507-514 [0063]
- **CHAMBERLAIN, N.L.; DRIVER, E.D.; MIESFELD, R.L.** The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res*, 1994, vol. 22, 3181-3186 [0063]
- **SUBIK, K.; LEE, J.F.; BAXTER, L.; STRZEPEK, T.; COSTELLO, D.; CROWLEY, P.; XING, L.; HUNG, M.C.; BONFIGLIO, T.; HICKS, D.G. et al.** The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl)*, 2010, vol. 4, 35-41 [0063]
- **MOORE, N.L.; BUCHANAN, G.; HARRIS, J.; SELTH, L.A.; BIANCO-MIOTTO, T.; HANSON, A.R.; BIRRELL, S.; BUTLER, L.M.; HICKEY, T.; TILLEY, W.D.** An androgen receptor mutation in the MDA-MB-453 cell line model of molecular apocrine breast cancer compromises receptor activity. *Endocr Relat Cancer*, 2012 [0063]
- **WILSON, V.S.; BOBSEINE, K.; LAMBRIGHT, C.R.; GRAY, L.E., JR.** A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *ToxicolSci*, 2002, vol. 66, 69-81 [0063]
- **SIKORA, M.J.; CORDERO, K.E.; LARIOS, J.M.; JOHNSON, M.D.; LIPPMAN, M.E.; RAE, J.M.** The androgen metabolite 5alpha-andros-tane-3beta, 17beta-diol (3betaAdiol) induces breast cancer growth via estrogen receptor: implications for aromatase inhibitor resistance. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, vol. 115, 289-296 [0063]
- **SZELEI, J.; JIMENEZ, J.; SOTO, A.M.; LUIZZI, M.F.; SONNENSCHN, C.** Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor. *Endocrinology*, 1997, vol. 138, 1406-1412 [0063]

- **LIN, H.Y.; SUN, M.; LIN, C.; TANG, H.Y.; LONDON, D.; SHIH, A.; DAVIS, F.B.; DAVIS, P.J.** Androgen-induced human breast cancer cell proliferation is mediated by discrete mechanisms in estrogen receptor- $\alpha$ -positive and -negative breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009, vol. 113, 182-188 [0063]
- **KUENEN-BOUMEESTER, V.; VAN DER KWAST, T.H.; CLAASSEN, C.C.; LOOK, M.P.; LIEM, G.S.; KLIJN, J.G.; HENZEN-LOGMANS, S.C.** The clinical significance of androgen receptors in breast cancer and their relation to histological and cell biological parameters. *Eur J Cancer*, 1996, vol. 32A, 1560-1565 [0063]
- **SOREIDE, J.A.; LEA, O.A.; VARHAUG, J.E.; SKARSTEIN, A.; KVINNSLAND, S.** Androgen receptors in operable breast cancer: relation to other steroid hormone receptors, correlations to prognostic factors and predictive value for effect of adjuvant tamoxifen treatment. *Eur J Surg Oncol*, 1992, vol. 18, 112-118 [0063]
- **AGOFF, S.N.; SWANSON, P.E.; LINDEN, H.; HAWES, S.E.; LAWTON, T.J.** Androgen receptor expression in estrogen receptor-negative breast cancer. Immunohistochemical, clinical, and prognostic associations. *Am J Clin Pathol*, 2003, vol. 120, 725-731 [0063]
- **HICKEY, T.E.; ROBINSON, J.L.; CARROLL, J.S.; TILLEY, W.D.** Minireview: The Androgen Receptor in Breast Tissues: Growth Inhibitor, Tumor Suppressor, Oncogene?. *Mol Endocrinol*, 2012 [0063]
- **PETERS, A.A.; BUCHANAN, G.; RICCIARDELLI, C.; BIANCO-MIOTTO, T.; CENTENERA, M.M.; HARRIS, J.M.; JINDAL, S.; SEGARA, D.; JIA, L.; MOORE, N.L. et al.** Androgen receptor inhibits estrogen receptor- $\alpha$  activity and is prognostic in breast cancer. *Cancer Res*, 2009, vol. 69, 6131-6140 [0063]
- **POULIN, R.; BAKER, D.; LABRIE, F.** Androgens inhibit basal and estrogen-induced cell proliferation in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Breast Cancer Res Treat*, 1988, vol. 12, 213-225 [0063]
- **MACEDO, L.F.; GUO, Z.; TILGHMAN, S.L.; SABNIS, G.J.; QIU, Y.; BRODIE, A.** Role of androgens on MCF-7 breast cancer cell growth and on the inhibitory effect of letrozole. *Cancer Res*, 2006, vol. 66, 7775-7782 [0063]
- **YEH, S.; HU, Y.C.; WANG, P.H.; XIE, C.; XU, Q.; TSAI, M.Y.; DONG, Z.; WANG, R.S.; LEE, T.H.; CHANG, C.** Abnormal mammary gland development and growth retardation in female mice and MCF7 breast cancer cells lacking androgen receptor. *J. Exp. Med.*, 2003, vol. 198, 1899-1908 [0063]
- **COPS, E.J.; BIANCO-MIOTTO, T.; MOORE, N.L.; CLARKE, C.L.; BIRRELL, S.N.; BUTLER, L.M.; TILLEY, W.D.** Antiproliferative actions of the synthetic androgen, mibolerone, in breast cancer cells are mediated by both androgen and progesterone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008, vol. 110, 236-243 [0063]
- **DIMITRAKAKIS, C.; BONDY, C.** Androgens and the breast. *Breast Cancer Res*, 2009, vol. 11, 212 [0063]
- **GALLICCHIO, L.; MACDONALD, R.; WOOD, B.; RUSHOVICH, E.; HELZLSOUER, K.J.** Androgens and musculoskeletal symptoms among breast cancer patients on aromatase inhibitor therapy. *Breast Cancer Res Treat*, 2011 [0063]
- **MORRIS, K.T.; TOTH-FEJEL, S.; SCHMIDT, J.; FLETCHER, W.S.; POMMIER, R.F.** High dehydroepiandrosterone-sulfate predicts breast cancer progression during new aromatase inhibitor therapy and stimulates breast cancer cell growth in tissue culture: a renewed role for adrenalectomy. *Surgery*, 2001, vol. 130, 947-953 [0063]
- **HALL, J.M.; KORACH, K.S.** Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, 2003, vol. 17, 792-803 [0063]
- **SAUVE, K.; LEPAGE, J.; SANCHEZ, M.; HEVEKER, N.; TREMBLAY, A.** Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer Res*, 2009, vol. 69, 5793-5800 [0063]
- **MASIELLO, D.; CHENG, S.; BUBLEY, G.J.; LU, M.L.; BALK, S.P.** Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor. *J Biol Chem*, 2002, vol. 277, 26321-26326 [0063]
- **KANG, Z.; JANNE, O.A.; PALVIMO, J.J.** Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Mol Endocrinol*, 2004, vol. 18, 2633-2648 [0063]
- **PANET-RAYMOND, V.; GOTTLIEB, B.; BEITEL, L.K.; PINSKY, L.; TRIFIRO, M.A.** Interactions between androgen and estrogen receptors and the effects on their transactivational properties. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, vol. 167, 139-150 [0063]
- **MIGLIACCIO, A.; DI DOMENICO, M.; CASTORIA, G.; NANAYAKKARA, M.; LOMBARDI, M.; DE FALCO, A.; BILANCIO, A.; VARRICCHIO, L.; CIOCIOLA, A.; AURICCHIO, F.** Steroid receptor regulation of epidermal growth factor signaling through Src in breast and prostate cancer cells: steroid antagonist action. *Cancer Res*, 2005, vol. 65, 10585-10593 [0063]
- **PARK SEHO; PARK HYUNG SEOK; KOO JA SEUNG; YANG WOO ICK; KIM SEUNG IL; PARK BYEONG-WOO.** Higher expression of androgen receptor is a significant predictor for better endocrine-responsiveness in estrogen receptor-positive breast cancers. *Breast cancer research and treatment*, 2012, vol. 133(1), 311-320 [0063]