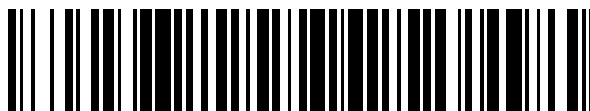


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 904**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2014 PCT/IB2014/002675**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015 WO15052583**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2014 E 14824529 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3055429**

54 Título: **Método para el pronóstico y tratamiento de cáncer metastatizante del hueso que se origina a partir de cáncer de mama**

30 Prioridad:

**09.10.2013 US 201361888984 P**

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

**21.10.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GOMIS, ROGER;  
PLANET, EVARIST;  
PAVLOVIC, MILICA;  
ARNAL, ANNA y  
TARRAGONA, MARIA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 727 904 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para el pronóstico y tratamiento de cáncer metastatizante del hueso que se origina a partir de cáncer de mama

**Antecedentes de la invención****5 Campo de la invención**

En un aspecto, el presente documento se refiere al pronóstico de una metástasis ósea en cáncer de mama positivo para ERBB2 (positivo para receptor epidérmico humano 2, HER2+), basándose en la determinación de los niveles del gen MAF y/o la amplificación o translocación del locus 16q23 o 16q22-24, en una muestra de tumor primario. Asimismo, en un aspecto, el presente documento también se refiere a un método para diseñar una terapia personalizada en un sujeto con cáncer de mama con positivo para ERBB2 (positivo para receptor epidérmico humano 2, HER2+), que comprende determinar el nivel de expresión del gen MAF y/o la amplificación o translocación del locus 16q23 o 16q22-24. Finalmente, en otro aspecto, el presente documento se refiere al uso de un inhibidor de c-Maf como agente terapéutico en el tratamiento de metástasis de cáncer de mama HER2+, en particular metástasis ósea.

**15 Técnica anterior**

El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común en todo el mundo (el 10,4%; después del cáncer de pulmón) y la quinta causa más común de muerte por cáncer (después del cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de hígado y cáncer de colon). Entre las mujeres, el cáncer de mama es la causa más común de muerte por cáncer. En 2005, el cáncer de mama provocó 502.000 muertes en todo el mundo (el 7% de las muertes por cáncer; casi el 1% de todas las muertes). El número de casos en todo el mundo ha aumentado significativamente desde la década de 1970, un fenómeno que se debe en parte al estilo de vida moderno en el mundo occidental.

El cáncer de mama se clasifica en estadios según el sistema TNM. (Véase el Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer. AJCC Cancer Staging Manual. 6ª ed. Nueva York, Nueva York: Springer, 2002). El pronóstico está estrechamente relacionado con los resultados de la clasificación en estadios, y la clasificación en estadios también se usa para asignar a los pacientes tratamientos tanto en ensayos clínicos como en la práctica médica. La información para clasificar en estadios es la siguiente:

- TX: el tumor primario no puede evaluarse. T0: no hay evidencia de tumor. Tis: carcinoma *in situ*, sin invasión. T1: el tumor mide 2 cm o menos. T2: el tumor mide más de 2 cm, pero menos de 5 cm. T3: el tumor mide más de 5 cm. T4: tumor de cualquier tamaño que crece en la pared de la mama o la piel, o cáncer de mama inflamatorio.
- NX: los ganglios linfáticos cercanos no pueden evaluarse. N0: el cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales. N1: el cáncer se ha diseminado a de 1 a 3 ganglios linfáticos axilares o a un ganglio linfático mamario interno. N2: el cáncer se ha diseminado a de 4 a 9 ganglios linfáticos axilares o a múltiples ganglios linfáticos mamaros internos. N3: se aplica uno de los siguientes:
  - El cáncer se ha diseminado a 10 ganglios linfáticos axilares o más, o el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos infraclaviculares, o el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos supraclaviculares o el cáncer afecta los ganglios linfáticos axilares y se ha diseminado a los ganglios linfáticos mamaros internos, o el cáncer afecta a 4 ganglios linfáticos axilares o más y se encuentran cantidades mínimas de cáncer en los ganglios mamaros internos o en la biopsia del ganglio linfático centinela.
- MX: no puede evaluarse la presencia de diseminación a sitios distantes (metástasis). M0: no hay diseminación a sitios distantes. M1: se ha producido diseminación a órganos distantes que no incluyen el ganglio linfático supraclavicular.

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

Todas las células tienen receptores en su superficie, en su citoplasma y en el núcleo celular. Determinados mensajeros químicos, como las hormonas, se unen a dichos receptores y esto provoca cambios en la célula. Hay tres receptores significativos que pueden afectar a las células de cáncer de mama: receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y HER2/neu. Con el propósito de nombrar las células que tienen cualquiera de estos receptores, se coloca un signo positivo a las mismas cuando el receptor está presente y un signo negativo si está ausente: positivas para ER (ER+), negativas para ER (ER-), positivas para PR (PR+), negativas para PR (PR-),

positivas para HER2 (HER2+) y negativas para HER2 (HER2-). El estado del receptor se ha convertido en una evaluación crítica para todos los cánceres de mama, ya que determina la idoneidad de usar tratamientos específicos, por ejemplo, tamoxifeno o trastuzumab.

5 La obtención de perfiles de alineamientos de expresión génica no supervisada ha proporcionado evidencias biológicas de la heterogeneidad del cáncer de mama mediante la identificación de subtipos intrínsecos tales como luminal A, luminal B, HER2+/ER y el subtipo de tipo basal.

10 Los cánceres HER2+ se definen como tumores que sobreexpresan el gen HER2, incluidos diferentes niveles de sobreexpresión. Este subgrupo representa el 30% de todos los tipos de cáncer de mama. Está fuertemente asociado con el aumento de la recidiva de la enfermedad y un mal pronóstico. También se sabe que la sobreexpresión se produce en cáncer de ovario, estómago y formas agresivas de cáncer de útero, como el cáncer de endometrio seroso uterino.

15 La piedra angular para tratar el cáncer de mama es la cirugía cuando el tumor está localizado con una posible terapia hormonal adyuvante (con tamoxifeno o un inhibidor de la aromatasas), quimioterapia y/o radioterapia. Actualmente, las sugerencias para el tratamiento después de la cirugía (terapia adyuvante) siguen un patrón. Este patrón está sujeto a cambios porque cada dos años se celebra una conferencia mundial en St. Gallen, Suiza, para comentar los resultados reales de los estudios multicéntricos a nivel mundial. Asimismo, dicho patrón también se revisa según el criterio de consenso del Instituto Nacional de Salud (NIH). Basándose en estos criterios, más del 85-90% de los pacientes que no tienen metástasis en los ganglios linfáticos serían candidatos para recibir terapia sistémica adyuvante. Los pacientes HER2+ son susceptibles de una terapia dirigida adyuvante contra HER2. HER2 es la diana del anticuerpo monoclonal trastuzumab (comercializado como Herceptin). Trastuzumab es eficaz solo en casos de cáncer en los que se sobreexpresa HER2. Los anticuerpos monoclonales alternativos, tales como pertuzumab, que inhibe la dimerización de los receptores HER2 y HER3, anticuerpos combinados contra fármacos, T-DM1 y pequeños inhibidores son posibles opciones terapéuticas dirigidas. Las pruebas de HER2 se realizan en pacientes con cáncer de mama para evaluar el pronóstico y determinar la idoneidad para la terapia con trastuzumab. Es importante que el trastuzumab se restrinja a individuos positivos para HER2, ya que es caro y se ha asociado con toxicidad cardíaca. Para los tumores HER2-, los riesgos del trastuzumab superan claramente a los beneficios.

20 Por lo general, las pruebas se realizan en muestras de biopsia obtenidas mediante aspiración con aguja fina, biopsia con aguja gruesa, biopsia de mama asistida por vacío o excisión quirúrgica. La inmunohistoquímica se usa para medir la cantidad de proteína HER2 presente en la muestra. Alternativamente, la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) puede usarse para medir el número de copias del gen, que están presentes.

30 Actualmente, los ensayos de PCR como Oncotype DX o los ensayos de microalineamientos tales como MammaPrint pueden predecir el riesgo de recaída del cáncer de mama según la expresión de genes específicos. En febrero de 2007, el ensayo MammaPrint se convirtió en el primer indicador de cáncer de mama en lograr la autorización oficial de la Administración de Alimentos y Medicamentos.

35 La solicitud de patente EP1961825-A1 describe un método para predecir la aparición de metástasis de cáncer de mama en hueso, pulmón, hígado o cerebro, que comprende determinar en una muestra de tejido tumoral el nivel de expresión de uno o más marcadores con respecto a su nivel de expresión correspondiente en una muestra de control, entre los cuales se incluye MAF. Sin embargo, este documento requiere determinar varios genes simultáneamente para permitir determinar la supervivencia de pacientes con cáncer de mama y la correlación entre las capacidades de la firma del gen para predecir la supervivencia libre de metástasis ósea no fue estadísticamente significativa.

La solicitud de patente US2011/0150979 describe un método para predecir el pronóstico de un cáncer de mama de tipo basal que comprende detectar el nivel de FOXC1.

45 La solicitud de patente US2010/0210738 se refiere a un método para realizar el pronóstico de un cáncer en un sujeto con cáncer de mama triple negativo que comprende detectar en una muestra los niveles de expresión de una serie de genes que están regulados por incremento o regulados por disminución al azar.

La solicitud de patente US2011/0130296 se refiere a la identificación de genes marcadores útiles en el diagnóstico y pronóstico de cáncer de mama triple negativo.

50 Existe la necesidad de identificar nuevos marcadores que permitan predecir la probabilidad de que un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo desarrolle metástasis. La identificación de nuevos factores pronóstico servirá como guía para seleccionar los tratamientos más adecuados.

### Sumario de la invención

55 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para predecir el riesgo de metástasis ósea de un cáncer de mama HER2+ y/o el desenlace clínico de un cáncer de mama HER2+ en un sujeto que padece dicho cáncer, que comprende

i) determinar la amplificación o el número de copias del gen MAF en una muestra de cáncer de mama HER2+ de dicho sujeto y

ii) comparar la amplificación o el número de copias obtenido en la etapa i) con un valor de referencia,

5 en el que el aumento del número de copias o el grado de amplificación de dicho gen con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de un riesgo aumentado de desarrollar una metástasis ósea y/o un mal desenlace clínico.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto con cáncer de mama HER2+ que comprende

i) cuantificar la amplificación o el número de copias del gen MAF en una muestra de cáncer de mama HER2+ de dicho sujeto y

10 ii) comparar la amplificación o el número de copias obtenido en i) con un valor de referencia,

en el que si el número de copias o el grado de amplificación está aumentado con respecto a dicho valor de referencia, dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia que tiene como objetivo prevenir y/o tratar una metástasis ósea y/o una terapia que tiene como objetivo evitar y/o prevenir la degradación ósea,

15 en el que si el número de copias o el grado de amplificación no está aumentado con respecto a dicho valor de referencia, dicho sujeto no es susceptible de recibir una terapia para prevenir y/o tratar una metástasis ósea y/o una terapia para evitar y/o prevenir la degradación ósea.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a un agente que puede evitar o prevenir la degradación ósea para su uso en la prevención, inhibición o el tratamiento de una metástasis ósea de cáncer de mama HER2+ o evitar o prevenir la degradación ósea en cáncer de mama HER2+ en un sujeto que ha sido identificado que tiene una amplificación del gen MAF o un número de copias aumentado en comparación con un valor de referencia, en el que el agente que puede evitar o prevenir la degradación ósea se selecciona del grupo que consiste en un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, un inhibidor de PTH o uno de PTHLH, incluidos los anticuerpos bloqueantes, o formas recombinantes de los mismos, un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor dual de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógenos, calcitonina, un inhibidor de la cathepsina K y Alfaradin.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para tipificar una muestra de un sujeto que padece cáncer de mama HER2+, comprendiendo el método:

(a) proporcionar una muestra de cáncer de mama HER2+ de dicho sujeto;

(b) cuantificar la amplificación o el número de copias de MAF en dicha muestra;

30 (c) tipificar dicha muestra comparando la amplificación cuantificada o el número de copias de MAF cuantificado con un nivel de referencia de MAF predeterminado;

en el que dicha tipificación proporciona información de pronóstico relacionada con el riesgo de metástasis ósea en dicho sujeto.

35 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para clasificar un sujeto que padece cáncer de mama HER2+ en una cohorte, que comprende: a) determinar la amplificación o el número de copias de MAF en una muestra de cáncer de mama HER2+ de dicho sujeto; b) comparar la amplificación o el número de copias de MAF en dicha muestra con un nivel de referencia de MAF predeterminado; y c) clasificar dicho sujeto en una cohorte basándose en dicha amplificación o número de copias de MAF en la muestra.

### Breve descripción de los dibujos

40 Figura 1: 16q22-24, incluida la asociación del gen MAF con la incidencia de metástasis ósea en tumores primarios de cáncer de mama.

a) FISH usando una sonda de región 16q23, dentro de la región amplificada de ADN de 16q22-24, y sondas CEP16(16q11.2) para medir la amplificación de ADN de 16q22-24 en tejidos de cáncer de mama primario HER2+. Imágenes representativas de una muestra de paciente sin amplificación de 16q23 (Case1, CNA de 16q23/CEP16 < 1,5 copias) y con amplificación de 16q23 (Case2, CNA de 16q23/CEP16 > 1,5 copias).

45 b) Incidencia acumulada de metástasis ósea en cualquier momento, usando la muerte antes de la recidiva en hueso como un evento competitivo en el conjunto de datos de tumores primarios humanos de BC (*breast cancer*, cáncer de mama) en estadio I, II y III (n = 334). Los pacientes se estratificaron según el grupo CNA de 16q23/CEP16 negativa (< 1,5) y CNA de 16q23/CEP16 positiva (> o = 1,5) basado en el punto de corte de 1,5 copias de 16q23/CEP16 por célula. Se puntuaron un mínimo de 50 células por núcleo y 3 núcleos por tumor. HR, relación de riesgo, IC, intervalo de confianza.

50

**Descripción detallada de la invención**Definiciones de términos y expresiones generales.

5 “Y/o” cuando se usa en el presente documento se debe tomar como divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, ‘A y/o B’ debe tomarse como una divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se expusiera individualmente en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, “agente para evitar o prevenir la degradación ósea” se refiere a cualquier molécula que puede prevenir, inhibir, tratar, reducir o detener la degradación ósea, ya sea estimulando la proliferación de osteoblastos o inhibiendo la proliferación de osteoclastos o fijando la estructura ósea.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “amplificación de un gen” se refiere a un proceso a través del cual se forman diversas copias de un gen o de un fragmento génico en una célula individual o una línea celular. Las copias del gen no están ubicadas necesariamente en el mismo cromosoma. La región duplicada a menudo se denomina “amplicón”. Normalmente, la cantidad de ARNm producido, es decir, el nivel de expresión génica, también aumenta en proporción al número de copias de un gen particular.

15 Tal como se usa en el presente documento, “HER2+” se refiere a un cáncer de mama que se caracteriza por células tumorales con expresión del receptor de tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2 o ErbB2) y/o amplificación del gen HER2 detectables, un receptor que normalmente está ubicado en la superficie celular. Tal como se usa en el presente documento, las células tumorales se consideran negativas para la sobreexpresión de HER2 si obtienen una puntuación de resultado de prueba de 0 o 1+, o 2+ cuando se analizan con un kit HercepTest™ (código K5204, Dako North America, Inc, Carpinteria, CA), un ensayo inmunohistoquímico semicuantitativo que usa un anticuerpo primario policlonal anti-HER2 o si son negativos para FISH de HER2.

20 Tal como se usa en el presente documento, “gen c-MAF” o “MAF” (homólogo del oncogén de fibrosarcoma musculoesquelético v-maf (aviar) también conocido como MAF o MGC71685) es un factor de transcripción que contiene una cremallera de leucina que actúa como homodímero o heterodímero. Dependiendo del sitio de unión al ADN, la proteína codificada puede ser un activador o represor transcripcional. La secuencia de ADN que codifica para MAF se describe en la base de datos de NCBI con el número de registro NG\_016440 (SEQ ID NO: 1 (codificante)). La secuencia genómica de MAF se expone en la SEQ ID NO: 13. Los métodos de la presente invención pueden usar o bien la secuencia codificante o bien la secuencia de ADN genómico. Se transcriben dos ARN mensajeros a partir de dicha secuencia de ADN, cada uno de los cuales dará lugar a una de las dos isoformas de la proteína MAF, la isoforma  $\alpha$  y la isoforma  $\beta$ . Las secuencias de ADN complementarias para cada una de dichas isoformas se describen, respectivamente, en la base de datos de NCBI con los números de registro NM\_005360.4 (SEQ ID NO: 2) y NM\_001031804.2 (SEQ ID NO: 3). El uso del gen MAF para predecir el pronóstico del cáncer se encuentra, por ejemplo, en las solicitudes internacionales n.ºs PCT/IB2013/001204 y PCT/ES2011/070693 y las solicitudes estadounidenses n.ºs 13/878.114 y 13/878.114 (cáncer de mama triple negativo y cáncer de mama ER+), la solicitud internacional n.º PCT/US2014/026154 (carcinoma de células renales), la solicitud internacional n.º PCT/US2014/028722 (cáncer de mama), la solicitud internacional n.º PCT/US2013/044584 (cáncer de pulmón), la solicitud estadounidense n.º 14/050.262 y la solicitud internacional n.º PCT/IB2013/002866 (cáncer de próstata), la solicitud estadounidense n.º 14/213.670 y la solicitud internacional n.º PCT/US2014/028569 (cáncer metastásico).

40 Tal como se usa en el presente documento, un “agente inhibidor de MAF” se refiere a cualquier molécula que puede inhibir total o parcialmente la expresión del gen MAF, tanto impidiendo que se produzca el producto de expresión de dicho gen (lo que interrumpe la transcripción del gen MAF y/o bloquea la traducción del ARNm procedente de la expresión del gen MAF) como inhibiendo directamente la actividad de la proteína c-Maf. Pueden identificarse inhibidores de la expresión del gen MAF usando métodos basados en la capacidad de c-Maf para promover la proliferación celular *in vitro* tal como se muestra en la publicación de patente internacional WO2005/046731 basándose en la capacidad de un inhibidor o compuesto de prueba para bloquear la capacidad de transcripción de un gen indicador bajo el control del promotor de ciclina D2 o de un promotor que contiene la región sensible a c-Maf (elemento sensible a c-Maf o MARE) en células que expresan c-Maf tal como se describe en la publicación de patente internacional WO2008/098351. También pueden identificarse variantes de c-Maf basándose en la capacidad de un inhibidor para bloquear la expresión del gen indicador bajo el control del promotor de IL-4 en respuesta a la estimulación con PMA/ionomicina en células que expresan NFATc2 y c-Maf tal como se describe en la publicación estadounidense n.º US2009/048117A.

55 Tal como se usa en el presente documento, la diana de mamífero de rapamicina (mTOR) o “mTor” se refiere a aquellas proteínas que corresponden a EC 2.7.11.1. Las enzimas mTor son serina/treonina proteína cinasas y regulan la proliferación celular, la motilidad celular, el crecimiento celular, la supervivencia celular y la transcripción.

Tal como se usa en el presente documento, un “inhibidor de mTor” se refiere a cualquier molécula que puede inhibir total o parcialmente la expresión del gen mTor, tanto impidiendo que se produzca el producto de expresión de dicho gen (lo que interrumpe la transcripción del gen mTor y/o bloquea la traducción del ARNm procedente de la expresión

del gen mTor) como inhibiendo directamente la actividad de la proteína mTor, incluidos los inhibidores que tienen una diana doble o más dianas y entre ellos la actividad de la proteína mTor.

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

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

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

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

20 Tal como se usa en el presente documento, "desenlace" o "desenlace clínico" se refiere a la evolución resultante de la enfermedad y/o la progresión de la enfermedad y puede caracterizarse, por ejemplo, por recidiva, periodo de tiempo hasta la recidiva, metástasis, periodo de tiempo hasta la metástasis, número de metástasis, número de sitios de metástasis y/o muerte por enfermedad. Por ejemplo, un buen desenlace clínico incluye curación, prevención de recidiva, prevención de metástasis y/o supervivencia dentro de un periodo de tiempo fijo (sin recidiva), y un mal desenlace clínico incluye progresión de la enfermedad, metástasis y/o muerte dentro de un periodo de tiempo fijo.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "nivel de expresión" de un gen se refiere a la cantidad medible de producto génico producido por el gen en una muestra del sujeto, en el que el producto génico puede ser un producto transcripcional o un producto de traducción. Por consiguiente, el nivel de expresión puede pertenecer a un producto génico de ácido nucleico tal como ARNm o ADNc o un producto génico polipeptídico. El nivel de expresión se deriva de una muestra de un sujeto y/o una muestra o muestras de referencia y, por ejemplo, puede detectarse *de novo* o corresponder a una determinación previa. El nivel de expresión puede determinarse o medirse, por ejemplo, usando métodos de microalineamientos, métodos de PCR (tal como qPCR) y/o métodos basados en anticuerpos, como sabe un experto en la técnica.

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

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

45 "Sonda", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de oligonucleótido que es complementaria de una secuencia de ácido nucleico específica de interés. En algunas realizaciones, las sondas pueden ser específicas para regiones de cromosomas que se sabe que experimentan translocaciones. En algunas realizaciones, las sondas tienen una etiqueta o etiqueta específica. En algunas realizaciones, la etiqueta es un fluoróforo. En algunas realizaciones, la sonda es una sonda de hibridación *in situ* de ADN cuyo marcaje se basa en la unión por coordinación estable de platino a ácidos nucleicos y proteínas. En algunas realizaciones, la sonda se describe en la solicitud de patente estadounidense 12/067532 y la solicitud de patente estadounidense 12/181.399 o es tal como se describe en Swennenhuis *et al.* "Construction of repeat-free fluorescence *in situ* hybridization probes" Nucleic Acids Research 40 (3): e20 (2012).

55 "Etiqueta" o "marcador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula física que se asocia directa o indirectamente con una sonda, permitiendo que la sonda o la ubicación de la sonda se visualice, marque o capture de otra manera.

"Translocación", tal como se usa en el presente documento, se refiere al intercambio de material cromosómico en

cantidades iguales o desiguales entre los cromosomas. En algunos casos, la translocación es en el mismo cromosoma. En algunos casos, la translocación es entre diferentes cromosomas. Las translocaciones se producen con una alta frecuencia en muchos tipos de cáncer, incluidos el cáncer de mama y la leucemia. Las translocaciones pueden ser translocaciones recíprocas primarias o las translocaciones secundarias más complejas. Existen varias translocaciones primarias que involucran el locus de la cadena pesada de inmunoglobina (IgH) que se cree que constituyen el evento iniciador en muchos cánceres. (Eychène, A, Rocques, N. y Puoponnot, C, A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8: 683-693.)

“Poliploide” o “poliploidía”, tal como se usa en el presente documento, indica que la célula contiene más de dos copias de un gen de interés. En algunos casos, el gen de interés es MAF. En algunas realizaciones, la poliploidía está asociada con una acumulación de expresión del gen de interés. En algunas realizaciones, la poliploidía está asociada con inestabilidad genómica. En algunas realizaciones, la inestabilidad genómica puede conducir a translocaciones cromosómicas.

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

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

“Metástasis”, tal como se usa en el presente documento, se entiende como la propagación de un cáncer desde el órgano donde comenzó a un órgano diferente. Generalmente se produce a través de la sangre o del sistema linfático. Cuando las células cancerosas se diseminan y forman un nuevo tumor, este último se denomina tumor secundario o metastásico. Las células cancerosas que forman el tumor secundario son como las del tumor original. Si un cáncer de mama, por ejemplo, se disemina (metastatiza) al pulmón, el tumor secundario está formado por células de cáncer de mama malignas. La enfermedad en el pulmón es cáncer de mama metastásico y no cáncer de pulmón. En una realización particular del método de la presente invención, la metástasis es cáncer de mama HER2+ que se ha diseminado (metastatizado) al hueso.

“Predicción”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la determinación de la probabilidad de que el sujeto que padece cáncer de mama HER2+ desarrolle metástasis en un órgano distante. Tal como se usa en el presente documento, “buen pronóstico” indica que se espera (por ejemplo, se predice) que el sujeto sobrevivirá y/o no tendrá, o corre un bajo riesgo de tener, recidiva o metástasis distantes dentro de un periodo de tiempo determinado. El término “bajo” es un término relativo y, en el contexto de esta solicitud, se refiere al riesgo del grupo de expresión “baja” con respecto a un desenlace clínico (recidiva, metástasis distantes, etc.). Un riesgo “bajo” se puede considerar como un riesgo más bajo que el riesgo promedio para una población de pacientes con cáncer heterogénea. En el estudio de Paik *et al.* (2004), un riesgo de recidiva “bajo” en general se consideró inferior al 15 por ciento. El riesgo también variará en función del periodo de tiempo. El periodo de tiempo puede ser, por ejemplo, de cinco años, diez años, quince años o incluso veinte años después de que se realizara el diagnóstico inicial de cáncer o después del pronóstico.

Tal como se usa en el presente documento, “mal pronóstico” indica que se espera, por ejemplo se predice, que el sujeto no sobrevivirá y/o tendrá, o corre un alto riesgo de tener, recidiva o metástasis distantes dentro de un periodo de tiempo determinado. El término “alto” es un término relativo y, en el contexto de esta solicitud, se refiere al riesgo del grupo de expresión “alta” con respecto a un desenlace clínico (recidiva, metástasis distantes, etc.). Un riesgo “alto” se puede considerar como un riesgo más alto que el riesgo promedio para una población de pacientes con cáncer heterogénea. En el estudio de Paik *et al.* (2004), un riesgo “alto” de recidiva global se consideró superior al 15 por ciento. El riesgo también variará en función del periodo de tiempo. El periodo de tiempo puede ser, por ejemplo, de cinco años, diez años, quince años o incluso veinte años desde que se realizara el diagnóstico inicial de cáncer o después del pronóstico.

“Valor de referencia”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un valor de análisis clínico usado como referencia para los valores/datos obtenidos mediante análisis clínicos de pacientes o muestras recogidas de pacientes. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto; un valor relativo; un valor que tiene un límite superior y/o inferior; un intervalo de valores; un valor promedio; una mediana de valores, un valor medio o un valor en comparación con un valor de referencia o control particular. Un valor de referencia se puede basar en un valor de muestra individual, tal como por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que se está sometiendo a prueba, pero en un punto en el tiempo anterior. El valor de referencia se puede basar en un gran número de muestras, tal como de una población de sujetos del grupo de edad cronológica coincidente, o en un grupo de muestras que incluyen o excluyen la muestra que va a someterse a prueba.

Tal como se usa en el presente documento, “sujeto” o “paciente” se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres

humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un hombre o una mujer humanos de cualquier edad o raza.

El término “tratamiento”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de terapia, que tiene como objetivo terminar, prevenir, mejorar o reducir la susceptibilidad a un estado clínico tal como se describe en el presente documento. En una realización preferida, el término tratamiento se refiere al tratamiento profiláctico (es decir, una terapia para reducir la susceptibilidad a un estado clínico), de un trastorno o estado tal como se define en el presente documento. Por tanto, “tratamiento”, “tratar” y sus términos equivalentes se refieren a la obtención de un efecto farmacológico o fisiológico deseado, que cubra cualquier tratamiento de un trastorno o estado patológico en un mamífero, incluido un humano. El efecto puede ser profiláctico en cuanto a prevenir completa o parcialmente un trastorno o síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en cuanto a una curación parcial o completa para un trastorno y/o un efecto adverso atribuible al trastorno. Es decir, “tratamiento” incluye (1) prevenir que el trastorno ocurra o recidive en un sujeto, (2) inhibir el trastorno, tal como detener su desarrollo, (3) parar o terminar el trastorno o al menos los síntomas asociados con el mismo, de modo que el huésped ya no padece el trastorno o sus síntomas, tal como provocar la regresión del trastorno o sus síntomas, por ejemplo, al restaurar o reparar una función perdida, ausente o defectuosa, o al estimular un proceso ineficiente, o (4) aliviar, paliar o mejorar el trastorno, o los síntomas asociados con el mismo, donde la mejora se usa en un sentido amplio para referirse a al menos una reducción de la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor o deficiencia inmunitaria.

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

“Muestra de tejido tumoral” se entiende como la muestra de tejido que se origina a partir del tumor de cáncer de mama primario HER2+. Dicha muestra se puede obtener mediante métodos convencionales, por ejemplo, biopsia, usando métodos bien conocidos por los expertos en técnicas médicas relacionadas.

La “metástasis ósea osteolítica” se refiere a un tipo de metástasis en la que se produce una reabsorción ósea (pérdida progresiva de la densidad ósea) en las proximidades de la metástasis que resulta de la estimulación de la actividad osteoclástica por las células tumorales y se caracteriza por un dolor intenso, fracturas patológicas, hipercalcemia, compresión de la médula espinal y otros síndromes resultantes de la compresión nerviosa.

Método para predecir una metástasis ósea de un cáncer de mama HER2+, basándose en el nivel de expresión de MAF

El nivel de expresión de MAF en muestras de cáncer de mama HER2+, se correlaciona con el riesgo de experimentar una metástasis ósea. Además, la expresión génica de MAF en tumores primarios HER2+, se correlaciona significativamente con la recidiva de metástasis ósea e inversamente con la supervivencia y supervivencia libre de metástasis ósea. Además, los niveles de expresión de MAF predicen una metástasis ósea de manera dependiente de la dosis.

En un primer aspecto, el presente documento se refiere a un método *in vitro* (a continuación en el presente documento, primer método del presente documento) para predecir una metástasis ósea de un cáncer de mama HER2+, en un sujeto que padece dicho cáncer, que comprende:

i) determinar el nivel de expresión del gen MAF en una muestra de dicho sujeto y

ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de referencia,

en el que un nivel de expresión aumentado de dicho gen con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de un riesgo aumentado de desarrollar una metástasis ósea.

El método del presente documento comprende, en una primera etapa, determinar el nivel de expresión del gen MAF en una muestra de un sujeto. En un aspecto preferido, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

Los métodos para obtener una muestra de biopsia incluyen la división de un tumor en pedazos grandes, o microdissección, u otros métodos de separación de células conocidos en la técnica. Las células tumorales se pueden obtener adicionalmente por medio de citología mediante aspiración con una aguja de pequeño calibre. Para simplificar la conservación y el manejo de las muestras, las muestras pueden fijarse en formalina y empaparse en parafina o congelarse en primer lugar y luego empaparse en un medio de congelación de tejidos como el compuesto OCT mediante inmersión en un medio altamente criogénico que permite una rápida congelación.

En un aspecto preferido, el primer método del presente documento comprende cuantificar solo el nivel de expresión del gen MAF como único marcador, es decir, el método no implica determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional.

Tal como entiende el experto en la técnica, el nivel de expresión génica puede cuantificarse midiendo los niveles de



ARN mensajero de dicho gen o de la proteína codificada por dicho gen, así como el número de translocaciones o copias de regiones genómicas que contienen dicho gen.

Para este propósito, la muestra biológica se puede tratar para romper física o mecánicamente la estructura celular o tisular, liberando los componentes intracelulares en una disolución acuosa u orgánica para preparar ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se extraen por medio de métodos disponibles comercialmente conocidos por el experto en la técnica (Sambrook, J, *et al.*, "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3ª ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y, vol. 1-3.)

Por tanto, puede cuantificarse el nivel de expresión del gen MAF a partir del ARN resultante de la transcripción de dicho gen (ARN mensajero o ARNm) o, alternativamente, a partir del ADN complementario (ADNc) de dicho gen. Por tanto, en un aspecto particular del presente documento, la cuantificación del nivel de expresión del gen MAF comprende la cuantificación del ARN mensajero del gen MAF o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario del gen MAF o un fragmento de dicho ADNc o las mezclas de los mismos.

Prácticamente cualquier método convencional puede usarse dentro del alcance del presente documento para detectar y cuantificar los niveles de ARNm codificados por el gen MAF o de su ADNc correspondiente. A modo de ilustración no limitativa, los niveles de ARNm codificados por dicho gen pueden cuantificarse usando métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden amplificación de ARNm y la cuantificación de dicho producto de amplificación de ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante transferencia de tipo Southern y usando sondas adecuadas, transferencia de tipo Northern y usando sondas específicas del ARNm del gen de interés (MAF) o de su ADNc correspondiente, mapeo con nucleasa S1, RT-PCR, hibridación, microalineamientos, etc., preferiblemente por medio de PCR cuantitativa en tiempo real usando un marcador adecuado. Del mismo modo, los niveles de ADNc correspondientes a dicho ARNm codificado por el gen MAF también se pueden cuantificar mediante el uso de técnicas convencionales; en este caso, el método del presente documento incluye una etapa para sintetizar el ADNc correspondiente por medio de la transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente seguido de la amplificación y cuantificación de dicho producto de amplificación de ADNc. Pueden encontrarse métodos convencionales para cuantificar el nivel de expresión, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001 (citado anteriormente). Estos métodos son conocidos en la técnica y un experto en la técnica estará familiarizado con las normalizaciones necesarias para cada técnica. Por ejemplo, las mediciones de expresión generadas usando PCR múltiplex deben normalizarse comparando la expresión de los genes que se miden con los denominados genes de "mantenimiento", cuya expresión debe ser constante en todas las muestras, proporcionando así una expresión de referencia para comparar con otros genes de control cuya expresión se sabe que está modulada con el cáncer.

En un aspecto particular, se cuantifica el nivel de expresión del gen MAF por medio de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCR) o un alineamiento de ADN/ARN o una técnica de hibridación de nucleótidos.

Además, también se puede cuantificar el nivel de expresión del gen MAF mediante la cuantificación del nivel de expresión de la proteína codificada por dicho gen, es decir, la proteína c-Maf (c-Maf) [NCBI, número de registro O75444], o cualquier variante funcionalmente equivalente de la proteína c-Maf. Hay dos isoformas de la proteína c-Maf, la isoforma  $\alpha$  (NCBI, NP\_005351.2) compuesta por 403 aminoácidos (SEQ ID NO: 4) y la isoforma  $\beta$  (NCBI, NP\_001026974.1) compuesta por 373 aminoácidos (SEQ ID NO: 5). Puede cuantificarse el nivel de expresión del gen MAF mediante la cuantificación del nivel de expresión de cualquiera de las isoformas de la proteína c-Maf. De este modo, en un aspecto particular, la cuantificación del nivel de la proteína codificada por el gen MAF comprende la cuantificación de la proteína c-Maf.

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

Las variantes según el presente documento tienen preferiblemente una similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las isoformas de la proteína c-Maf (SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5) de al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos

aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98% o al menos aproximadamente el 99%. El grado de similitud entre las variantes y las secuencias específicas de la proteína c-Maf definidas previamente se determina usando algoritmos y procesos informáticos que son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica. La similitud entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP [BLAST Manual, Altschul, S, *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S, *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

El nivel de expresión de la proteína c-Maf se puede cuantificar mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de un sujeto. A modo de ilustración no limitativa, dichos niveles de proteína pueden cuantificarse, por ejemplo, usando anticuerpos con capacidad de unión a c-Maf (o un fragmento de los mismos que contiene un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos usados en estos ensayos pueden estar marcados o no. Los ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden usar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos de quimioluminiscencia, sustratos o cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia gama de ensayos conocidos que se pueden usar en el presente documento, que usan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); estas técnicas incluyen inmunotransferencia de tipo Western o transferencia Western, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA de tipo sándwich de doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de microalineamientos de proteínas o biochips, incluidos anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas. Otros modos de detectar y cuantificar dicha proteína c-Maf incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligandos, etc. Cuando se usa un método inmunológico, puede usarse cualquier anticuerpo o reactivo que se sepa que se une a la proteína c-Maf con una alta afinidad para detectar la cantidad de la misma. Sin embargo, se prefiere el uso de un anticuerpo, por ejemplo, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, scFv, diacuerpos humanizados, triacuerpos, tetracuerpos, nanocuerpos (Nanobodies), alfacuerpos, péptidos de tipo grapa, ciclopéptidos y anticuerpos. En el mercado existen anticuerpos comerciales anti-proteína anti-c-Maf que se pueden usar en el contexto del presente documento, tal como por ejemplo los anticuerpos ab427, ab55502, ab55502, ab72584, ab76817, ab77071 (Abcam plc, 330 Science Park, Cambridge CB4 0FL, Reino Unido), el anticuerpo monoclonal O75444 (anticuerpo monoclonal de ratón anti-MAF humano libre de azida, no conjugado, clon 6b8) de AbD Serotec, etc. Hay muchas empresas comerciales que ofrecen anticuerpos anti-c-Maf, tales como Abnova Corporation, Bethyl Laboratories, Santa Cruz Biotechnology, Bioworld Technology, GeneTex, etc.

En un aspecto particular, los niveles de proteína c-Maf se cuantifican por medio de inmunotransferencia de tipo Western, ELISA o un alineamiento de proteína.

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

El primer método del presente documento comprende en una segunda etapa la comparación del nivel de expresión del gen MAF obtenido en la muestra (por ejemplo, muestra de tumor) del sujeto con un valor de referencia.

Una vez que el nivel de expresión del gen MAF en una muestra de un sujeto con cáncer de mama, por ejemplo, cáncer de mama HER2+, se ha medido y comparado con el valor de referencia, si el nivel de expresión de dicho gen está aumentado con respecto a dicho valor de referencia, entonces puede concluirse que dicho sujeto tiene una mayor tendencia a desarrollar una metástasis ósea.

La determinación del nivel de expresión del gen MAF debe correlacionarse con el valor de referencia.

En un aspecto, el/los valor(es) de referencia tal como se pretende en el presente documento puede(n) transmitir cantidades absolutas de MAF. En otro aspecto, la cantidad de uno cualquiera o más biomarcadores en una muestra de un sujeto sometido a prueba se puede determinar directamente en relación con el valor de referencia (por ejemplo, en cuanto al aumento o la disminución, o veces de aumento o veces de disminución). Ventajosamente, esto puede permitir comparar la cantidad de uno cualquiera o más biomarcadores en la muestra del sujeto con el valor de referencia (dicho de otro modo, medir la cantidad relativa de uno cualquiera o más biomarcadores en la muestra del sujeto con respecto al valor de referencia) sin la necesidad de determinar en primer lugar las cantidades absolutas respectivas de dichos uno o más biomarcadores.

En un aspecto preferido, el valor de referencia es el nivel de expresión del gen MAF en una muestra de control o una muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor que vaya a analizarse, la naturaleza exacta de la muestra de control o de referencia puede variar. Por tanto, en el caso de que vaya a evaluarse un pronóstico, entonces la

muestra de referencia es una muestra de un sujeto con cáncer de mama HER2+, que no ha metastatizado o que corresponde a la mediana de valores del nivel de expresión del gen MAF medido en una recogida de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de mama HER2+, que no han metastatizado.

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

En un aspecto particular, los valores de referencia para la expresión "aumentada" o "reducida" de la expresión de MAF se determinan calculando los percentiles por medios convencionales, lo que implica realizar ensayos en una o varias muestras aisladas de sujetos cuya enfermedad está bien documentada, mediante cualquiera de los métodos mencionados, por encima del nivel de expresión de MAF. El nivel "reducido" de MAF puede entonces asignarse preferiblemente a muestras en las que el nivel de expresión de MAF es igual a o menor que aproximadamente el percentil 50 en la población normal, incluido, por ejemplo, un nivel de expresión igual a o menor que aproximadamente el percentil 60 en la población normal, igual a o menor que aproximadamente el percentil 70 en la población normal, igual a o menor que aproximadamente el percentil 80 en la población normal, igual a o menor que aproximadamente el percentil 90 en la población normal, e igual a o menor que aproximadamente el percentil 95 en la población normal. El nivel de expresión génica de MAF "aumentado" puede entonces asignarse preferiblemente a muestras en las que el nivel de expresión génica de MAF es igual a o mayor que aproximadamente el percentil 50 en la población normal, incluido, por ejemplo, un nivel de expresión igual a o mayor que aproximadamente el percentil 60 en la población normal, igual a o mayor que aproximadamente el percentil 70 en la población normal, igual a o mayor que aproximadamente el percentil 80 en la población normal, igual a o mayor que aproximadamente el percentil 90 en la población normal, e igual a o mayor que aproximadamente el percentil 95 en la población normal.

El experto en la técnica entenderá que no es necesario que la predicción de la tendencia de un tumor de mama primario a metastatizar sea correcta para que se identifiquen todos los sujetos (es decir, para el 100% de los sujetos). No obstante, el término requiere permitir la identificación de una parte estadísticamente significativa de los sujetos (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohortes). El experto en la técnica puede determinar de manera simple si una parte es estadísticamente significativa, usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de los intervalos de confianza, la determinación de los valores de p, la prueba de la t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Se proporcionan detalles en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley and Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos de aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98% o al menos aproximadamente el 99%. Los valores de p son preferiblemente de 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 ó 0,0001. Más preferiblemente, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80% o al menos aproximadamente el 90% de los sujetos de una población pueden identificarse adecuadamente mediante el método del presente documento.

45 En aún otro aspecto, la metástasis de hueso es una metástasis ósea osteolítica.

En aún otro aspecto, un nivel de expresión de MAF que está por encima del promedio indica un riesgo aumentado de metástasis ósea, siendo dicho riesgo proporcional a los niveles de expresión de MAF. Por tanto, el riesgo de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de mama depende de la dosis.

50 Método para predecir el desenlace clínico de un paciente que padece metástasis ósea por cáncer de mama HER2+, basándose en el nivel de expresión de MAF

En otro aspecto, el presente documento se refiere a un método *in vitro* (a continuación en el presente documento, segundo método del presente documento) para predecir el desenlace clínico de un paciente que padece cáncer de mama HER2+metastásico óseo, que comprende:

- i) cuantificar el nivel de expresión del gen MAF en una muestra de dicho sujeto y
- 55 ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de referencia,

en el que un nivel de expresión aumentado de dicho gen con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de un mal desenlace clínico.

El segundo método del presente documento comprende, en una primera etapa, cuantificar el nivel de expresión del gen MAF en una muestra de un sujeto que padece cáncer de mama HER2+. En un aspecto preferido, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

5 En un aspecto preferido, el segundo método del presente documento comprende cuantificar solo el nivel de expresión del gen MAF como único marcador, es decir, el método no implica determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional.

10 En una segunda etapa, el nivel de expresión del gen MAF obtenido en la muestra de tumor del sujeto se compara con un valor de referencia. En un aspecto preferido, el valor de referencia es el nivel de expresión de dicho gen en una muestra de control. La determinación del nivel de expresión del gen MAF debe correlacionarse con los valores de una muestra de control o una muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor que vaya a analizarse, la naturaleza exacta de la muestra de control puede variar. Por tanto, en el caso que implica el segundo método del presente documento, entonces la muestra de referencia es una muestra de un sujeto con cáncer de mama que no ha experimentado metástasis ósea o que corresponde a la mediana de valores del nivel de expresión del gen MAF medido en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de mama que no han experimentado metástasis. Una vez que el nivel de expresión del gen MAF en la muestra se mide y se compara con la muestra de control, si el nivel de expresión de dicho gen está aumentado con respecto a su nivel de expresión en la muestra de control, entonces es indicativo de un mal desenlace clínico.

15 En un aspecto específico, la metástasis ósea es metástasis osteolítica.

20 En otro aspecto específico, la cuantificación del nivel de expresión del gen MAF comprende cuantificar el ARN mensajero (ARNm) de dicho gen, o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario (ADNc) de dicho gen, o un fragmento de dicho ADNc. En un aspecto más preferido, se cuantifica el nivel de expresión por medio de una reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (PCR) o un alineamiento de ADN o ARN.

25 En otro aspecto, la cuantificación del nivel de expresión génica de MAF comprende cuantificar el nivel de proteína codificada por dicho gen o de una variante de la misma. En un aspecto aún más preferido, el nivel de proteína se determina por medio de inmunotransferencia de tipo Western, inmunohistoquímica, ELISA o un alineamiento de proteína.

En otro aspecto, la muestra de referencia es una muestra de tejido tumoral de cáncer de mama HER2+, de un sujeto que no ha experimentado metástasis.

30 Cualquier parámetro que sea ampliamente aceptado para determinar el desenlace clínico de un paciente puede usarse en el presente documento, incluyendo, sin limitación:

- progresión libre de enfermedad que, tal como se usa en el presente documento, describe la proporción de sujetos en remisión completa que no han tenido recidiva de la enfermedad durante el periodo de tiempo en estudio.
- 35 • supervivencia libre de enfermedad (DFS por sus siglas en inglés), tal como se usa en la presente memoria, se entiende como el tiempo que transcurre después del tratamiento para una enfermedad durante el cual un sujeto sobrevive sin signos de la enfermedad.
- respuesta objetiva que, tal como se usa en el presente documento, describe la proporción de sujetos tratados en los que se observa una respuesta completa o parcial.
- 40 • control tumoral que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la proporción de sujetos tratados en los que se observa respuesta completa, respuesta parcial, respuesta menor o enfermedad estable  $\geq 6$  meses.
- supervivencia libre de progresión que, tal como se usa en el presente documento, se define como el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la primera medición de crecimiento del cáncer.
- 45 • tiempo hasta la progresión (TTP por sus siglas en inglés), tal como se usa en el presente documento, se refiere al tiempo después del tratamiento de una enfermedad hasta que la enfermedad comienza a empeorar. El término "progresión" se ha definido previamente.
- supervivencia libre de progresión de seis meses o tasa de "PFS6" que, tal como se usa en el presente documento, se refiere al porcentaje de sujetos que están libres de progresión en los primeros seis meses después del inicio de la terapia y
- 50 • mediana de supervivencia que, tal como se usa en el presente documento, se refiere al tiempo en el que la mitad de los sujetos incluidos en el estudio todavía están vivos.

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

Método para diseñar una terapia personalizada en pacientes con tumores de mama HER2+

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

Por tanto, tal como se describe en el presente documento, dado que la sobreexpresión del gen MAF en células cancerosas HER2+ está relacionada con la presencia de metástasis ósea, el nivel de expresión del gen MAF es útil para tomar decisiones en cuanto a la terapia más adecuada para el sujeto que padece dicho cancer

Así, en otro aspecto el presente documento se refiere a un método *in vitro* (a continuación en el presente documento, tercer método del presente documento) para diseñar una terapia personalizada para un sujeto que padece cáncer de mama HER2+, que comprende

i) cuantificar el nivel de expresión del gen MAF en una muestra de tumor de dicho sujeto (por ejemplo, una muestra de tejido tumoral, células tumorales circulantes, ADN tumoral circulante o exosomas derivados de tumor) y

ii) comparar el nivel de expresión obtenido en i) con un valor de referencia,

en el que si el nivel de expresión está aumentado con respecto a dicho valor de referencia, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia que tiene como objetivo prevenir y/o tratar la metástasis ósea. Si el nivel de expresión no está aumentado con respecto a dicho valor de referencia, entonces dicho sujeto no es susceptible de recibir una terapia para prevenir y/o tratar la metástasis ósea. En algunos aspectos, la muestra es una muestra derivada de un tumor, que incluye: una muestra de tumor, una muestra de tumor circulante, ADN de tumor circulante o exosomas derivados de tumor.

En un aspecto particular, la metástasis ósea es metástasis osteolítica.

El tercer método del presente documento comprende, en una primera etapa, cuantificar el nivel de expresión del gen MAF en una muestra en un sujeto que padece cáncer de mama HER2+. En un aspecto preferido, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

En otro aspecto particular, el tercer método del presente documento comprende cuantificar solo el nivel de expresión del gen MAF como único marcador, es decir, el método no implica determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional.

En el caso del tercer método del presente documento, la muestra puede ser una muestra de tejido tumoral primario del sujeto.

En una segunda etapa, el nivel de expresión del gen MAF obtenido en la muestra de tumor del sujeto se compara con un valor de referencia. En un aspecto preferido, el valor de referencia es el nivel de expresión del gen MAF de dicho gen en una muestra de control. La determinación del nivel de expresión del gen MAF debe relacionarse con los valores de una muestra de control o una muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor que vaya a analizarse, la naturaleza exacta de la muestra de control puede variar. Por tanto, preferiblemente, la muestra de referencia es una muestra de un sujeto con cáncer de mama HER2+, que no ha metastatizado o que corresponde a la mediana de valores del nivel de expresión del gen MAF medido en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de mama HER2+, que no ha metastatizado.

Una vez que el nivel de expresión del gen MAF en la muestra se ha medido y comparado con el valor de referencia,

si el nivel de expresión de dicho gen está aumentado con respecto al valor de referencia, se puede concluir que dicho sujeto es susceptible de recibir terapia o no recibir terapia que tiene como objetivo prevenir (si el sujeto aún ha de experimentar metástasis) y/o tratar la metástasis o no prevenir y/o tratar una metástasis (si el sujeto ya ha experimentado metástasis).

5 Cuando el cáncer ha metastatizado, se pueden usar tratamientos sistémicos incluyendo pero sin limitarse a, quimioterapia, tratamiento hormonal, inmunoterapia o una combinación de los mismos. Adicionalmente, puede usarse radioterapia y/o cirugía. La elección del tratamiento depende generalmente del tipo de cáncer primario, el tamaño, la ubicación de la metástasis, la edad, la salud general del paciente y los tipos de tratamientos usados anteriormente.

10 Los tratamientos sistémicos son aquellos que llegan a todo el cuerpo y podrían representar terapias que tienen el objetivo de prevenir o inhibir (si el sujeto aún ha de experimentar metástasis) y/o tratar la metástasis (si el sujeto ya ha experimentado metástasis), como:

15 • La quimioterapia es el uso de medicamentos para destruir las células cancerosas. Los medicamentos se administran generalmente por vía oral o intravenosa. A veces, la quimioterapia se usa junto con la radioterapia. Los tratamientos quimioterápicos adecuados para el cáncer de mama incluyen, sin limitación, antraciclinas (doxorubicina, epirubicina, doxorubicina liposomal pegilada), taxanos (paclitaxel, docetaxel, paclitaxel unido a nanopartícula de albúmina), 5-fluorouracilo (5-FU en infusión continua, capecitabina) alcaloides de vinca (vinorelbina, vinblastina), gemcitabina, sales de platino (cisplatino, carboplatino), ciclofosfamida, etopósido y combinaciones de uno o más de los anteriores, tales como regímenes de  
20 ciclofosfamida/antraciclina +/- 5-fluorouracilo (tales como doxorubicina/ciclofosfamida (AC), epirubicina/ciclofosfamida (EC), ciclofosfamida/epirubicina/5-fluorouracilo (CEF), ciclofosfamida/doxorubicina/5-fluorouracilo (CAF), 5-fluorouracilo/epirubicina/ciclofosfamida (FEC)), regímenes de ciclofosfamida/metotrexato/5-fluorouracilo (CMF), antraciclinas/taxanos (tales como doxorubicina/paclitaxel o doxorubicina/docetaxel), docetaxel/capecitabina, gemcitabina/paclitaxel,  
25 taxano/platino (tales como paclitaxel/carboplatino o docetaxel/carboplatino).

• La inmunoterapia es un tratamiento que ayuda al propio sistema inmunitario del paciente a combatir el cáncer. Existen varios tipos de inmunoterapia que se usan para tratar una metástasis en pacientes. Estos incluyen, pero no se limitan a, citocinas, anticuerpos monoclonales y vacunas antitumorales.

30 En otro aspecto, el tratamiento es Alpharadin (dicloruro de radio 223). Alpharadin usa radiación alfa de la desintegración del radio 223 para destruir células cancerosas. El radio 223 selecciona como diana por sí mismo de manera natural metástasis óseas en virtud de sus propiedades como mimético del calcio. La radiación alfa tiene un alcance muy corto de 2 a 10 células (en comparación con la radioterapia actual que se basa en la radiación beta o gamma) y, por tanto, provoca menos daño a los tejidos sanos circundantes (especialmente la médula ósea). Con propiedades similares al calcio, el radio 223 se dirige a lugares donde se usa el calcio para formar huesos en el  
35 cuerpo, incluido el sitio de crecimiento óseo anómalo y más rápido, tal como el que se observa en metástasis esqueléticas de hombres con cáncer de próstata avanzado, resistente a la castración. El radio 223, después de la inyección, se transporta en el torrente sanguíneo hasta sitios de crecimiento óseo anómalo. El lugar donde un cáncer comienza en el cuerpo se conoce como tumor primario. Algunas de estas células pueden desprenderse y ser transportadas en el torrente sanguíneo a otra parte del cuerpo. Las células cancerosas pueden asentarse entonces  
40 en esa parte del cuerpo y formar un nuevo tumor. Si esto sucede, se denomina cáncer secundario o metástasis. La mayoría de los pacientes con cáncer de próstata en estadio avanzado padecen la carga máxima de enfermedad en sus huesos. El objetivo del radio 223 es seleccionar como diana selectivamente este cáncer secundario. Cualquier cantidad de radio 223 no absorbida en los huesos se encamina rápidamente hacia el intestino y se excreta.

45 En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de mTor. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor es un inhibidor dual de mTor/cinasa PI3. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para prevenir o inhibir la metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se selecciona del grupo que consiste en: ABI009 (sirolimús), rapamicina (sirolimús), Abraxane (paclitaxel), Absorb (everolimús), Afinitor (everolimús), Afinitor con Gleevec, AS703026 (pimasertib), Axxess (umirolimús), AZD2014, BEZ235, Biofreedom (umirolimús), BioMatrix (umirolimús), BioMatrix flex (umirolimús), CC115, CC223, endoprótesis farmacológica de sirolimús de bioingeniería combinada  
50 ORBUSNEICH (sirolimús), Curaxin CBLC102 (mepacrina), DE109 (sirolimús), DS3078, Endeavour DES (zotarolimús), Endeavor Resolute (zotarolimús), Femara (letrozol), Hocena (antroquinonol), INK128, Inspiron (sirolimús), IPI504 (clorhidrato de retaspimicin), KRN951 (tivozanib), ME344, MGA031 (teplizumab), MiStent SES (sirolimús), MKC1, Nobori (umirolimús), OSI027, OVI123 (cordicepina), Palomid 529, PF04691502, Promus Element (everolimús), PWT33597, Rapamune (sirolimús), Resolute DES (zotarolimús), RG7422, SAR245409, SF1126,  
55 SGN75 (vorsetuzumab mafodotina), Synergy (everolimús), Taltorvic (ridaforolimús), Tarceva (erlotinib), Torisel (temsirolimús), Xience Prime (everolimús), Xience V (everolimús), Zomaxx (zotarolimús), Zortress (everolimús), endoprótesis periférica farmacológica de zotarolimús MEDTRONIC (zotarolimús), AP23841, AP24170, ARmTOR26, BN107, BN108, canstatina GENZYME (canstatina), CU906, EC0371, EC0565, KI1004, LOR220, NV128, rapamicina ONCOIMMUNE (sirolimús), SB2602, sirolimús PNP SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS (sirolimús), TOP216,  
60 VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, Advacan (everolimús), AZD8055, endoprótesis coronaria farmacológica de sirolimús Cypher Select Plus (sirolimús), endoprótesis coronaria farmacológica de sirolimús Cypher (sirolimús), balón

recubierto de fármaco (sirolimús), E-Magic Plus (sirolimús), EmTOR (sirolimús), Esprit (everolimús) Evertor (everolimús), HBF0079, LCP-Siro (sirolimús), Limus CLARIS (sirolimús), Inhibidor de mTOR CELLZOME, endoprótesis coronaria farmacoactiva de sirolimús Nevo (sirolimús), nPT-mTOR, Rapacan (sirolimús), Renacept (sirolimús), ReZolve (sirolimús), Rocas (sirolimús), SF1126, Sirolim (sirolimús), sirolimús NORTH CHINA (sirolimús), sirolimús RANBAXY (sirolimús), sirolimús WATSON (sirolimús) Siropan (sirolimús), Sirova (sirolimús), Supralimus (sirolimús), Supralimus-Core (sirolimús), tacrolimús WATSON (tacrolimús), TAF A93, temsirolimús ACCORD (temsirolimús), temsirolimús SANDOZ (temsirolimús), TOP216, Xience Prime (everolimús), Xience V (everolimús). En un aspecto específico, el inhibidor de mTor es Afinitor (everolimús) ([http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter\\_applied=true&Novald=4029462064338207963](http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&Novald=4029462064338207963); último acceso el 28/11/2012). En otro aspecto, se combina everolimús con un inhibidor de la aromatasas. (Véase, por ejemplo, Baselga, J. *et al.*, Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366(6): 520-529). En otro aspecto, pueden identificarse inhibidores de mTor a través de métodos conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Zhou, H. *et al.* Updates for mTor inhibitors. 2010. Anticancer Agents Med. Chem. 10(7): 571-81). En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para tratar, prevenir o inhibir la metástasis en un paciente que es positivo para un receptor hormonal. (Véase, por ejemplo, Baselga, J. *et al.*, Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366(6): 520-529). En algunos aspectos, el paciente es ER+. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para tratar, prevenir o inhibir la metástasis en un paciente con cáncer de mama avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa en combinación con un segundo tratamiento. En algunos aspectos, el segundo tratamiento es cualquier tratamiento descrito en el presente documento.

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

En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de la COX-2. En algunos aspectos, el inhibidor de la COX-2 se usa para prevenir o inhibir la metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de la COX-2 se selecciona del grupo: ABT963, paracetamol ER JOHNSON (paracetamol), Acular X (ketorolaco trometamina), BAY1019036 (aspirina), BAY987111 (difenhidramina, naproxeno sódico), BAY11902 (piroxicam), BCIBUH001 (ibuprofeno), Capoxigem (apricoxib), CS502, CS670 (pelubiprofeno), diclofenaco HPBCD (diclofenaco), Diractin (ketoprofeno), GW406381, HCT1026 (nitroflurbiprofeno), Hyanalgese-D (diclofenaco), HydrocoDex (paracetamol, dextrometorfano, hidrocodona), ibuprofeno sódico PFIZER (ibuprofeno sódico), ibuprofeno con paracetamol PFIZER (paracetamol, ibuprofeno), Impracor (ketoprofeno), IP880 (diclofenaco), IP940 (indometacina), ISV205 (diclofenaco sódico), JNS013 (paracetamol, clorhidrato de tramadol), ketoprofeno TDS (ketoprofeno), LTNS001 (naproxeno etemesil), mesalamina SALIX (mesalamina), mesalamina SOFAR (mesalamina), mesalazina (mesalamina), ML3000 (licofelona), MRX7EAT (etodolaco), naproxeno IROKO (naproxeno), NCX4016 (nitroaspirina), NCX701 (nitroparacetamol), Nuprin SCOLR (ibuprofeno), OMS103HP (clorhidrato de amitriptilina, ketoprofeno, clorhidrato de oximetazolina), Oralease (diclofenaco), OxycoDex (dextrometorfano, oxicodona), P54, Perco-Dex (paracetamol, dextrometorfano, oxicodona), PL3100 (naproxeno, fosfatidilcolina), PSD508, R-ketoprofeno (ketoprofeno), Remura (bromfenaco sódico), ROX828 (ketorolaco trometamina), RP19583 (ketoprofeno lisina), RQ00317076, SDX101 (R-etodolaco), TDS943 (diclofenaco sódico), TDT070 (ketoprofeno), TPR100, TQ1011 (ketoprofeno), TT063 (S-flurbiprofeno), UR8880 (cimicoxib), V0498TA01A (ibuprofeno), VT122 (etodolaco, propanolol), XP20B (paracetamol, dextropropoxifeno), XP21B (diclofenaco potásico), XP21L (diclofenaco potásico), Zoenasa (acetilcisteína, mesalamina), Acephen, Actifed Plus, Actifed-P, Acular, LS Acular, PF Acular, X Acular, Acuvail, Advil, Advil Allergy Sinus, Advil Cold and Sinus, Advil Congestion Relief, Advil PM, Advil PM Capsule, Air Salonpas, Airtal, Alcohol-Free NyQuil Cold & Flu Relief, Aleve, Aleve ABDI IBRAHIM, Aleve-D, Alka-Seltzer, Alka-Seltzer BAYER, Alka-Seltzer Extra Strength, Alka-Seltzer Lemon-Lime, Alka-Seltzer Original, Alka-Seltzer Plus, Alka-Seltzer plus Cold and Cough, Alka-Seltzer plus Cold and Cough Formula, Alka-Seltzer Plus Day and Night Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Day Non-Drowsy Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Flu Formula, Alka-Seltzer Plus Night Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Sinus Formula, Alka-Seltzer Plus Sparkling Original Cold Formula, Alka-Seltzer PM, Alka-Seltzer Wake-Up Call, Anacin, Anaprox, Anaprox MINERVA, Ansaid, apitoxina, Apranax, Apranax abdi, Arcoxia, Arthritis Formula Bengay, Arthrotec, Asacol, Asacol HD, Asacol MEDUNA ARZNEIMITTEL, Asacol ORIFARM, aspirina BAYER, complejo de aspirina, aspirina Migran, AZD3582, Azulfidine, Baralgan M, BAY1019036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001,

Benadryl Allergy, Benadryl Day and Night, Benylin 4 Flu, Benylin Cold and Flu, Benylin Cold and Flu Day and Night, Benylin Cold and Sinus Day and Night, Benylin Cold and Sinus Plus, Benylin Day and Night Cold and Flu Relief, Benylin1 All-In-One, Brexin, Brexin ANGELINI, Bromday, Bufferin, Buscopan Plus, Caldolor, Calmatel, Cambia, Canasa, Capoxigem, Cataflam, Celebrex, Celebrex ORIFARM, Children's Advil Allergy Sinus, Children's Tylenol, Children's Tylenol Cough and Runny Nose, Children's Tylenol plus cold, Children's Tylenol plus Cold and Cough, Children's Tylenol plus cold and stuffy nose, Children's Tylenol plus Flu, Children's Tylenol plus cold & allergy, Children's Tylenol plus Cough & Runny Nose, Children's Tylenol plus Cough & Sore Throat, Children's Tylenol plus multi symptom cold, Clinoril, Codral Cold and Flu, Codral Day and Night Day comprimidos, Codral Day and Night Night comprimidos, Codral Nighttime, Colazal, Combunox, Contac Cold plus Flu, Contac Cold plus Flu Non-Drowsy, Coricidin D, Coricidin HBP Cold and Flu, Coricidin HBP Day and Night Multi-Symptom Cold, Coricidin HBP Maximum Strength Flu, Coricidin HBP Nighttime Multi-Symptom Cold, Coricidin II Extra Strength Cold and Flu, CS502, CS670, Daypro, Daypro Alta, DDS06C, Demazin Cold and Flu, Demazin Cough, Cold and Flu, Demazin day/night Cold and Flu, Demazin PE Cold and Flu, Demazin PE day/night Cold and Flu, diclofenaco HPBCD, Dimetapp Day Relief, Dimetapp Multi-Symptom Cold and Flu, Dimetapp Night Relief, Dimetapp Pain and Fever Relief, Dimetapp PE Sinus Pain, Dimetapp PE Sinus Pain plus Allergy, Dipentum, Diractin, Disprin Cold 'n' Fever, Disprin Extra, Disprin Forte, Disprin Plus, Dristan Cold, Dristan Junior, Drixoral Plus, Duexis, Dynastat, Efferalgan, Efferalgan Plus Vitamin C, Efferalgan Vitamin C, Elixsure IB, Excedrin Back and Body, Excedrin Migraine, Excedrin PM, Excedrin Sinus Headache, Excedrin Tension Headache, Falcol, Fansamac, Feldene, FeverAll, Fiorinal, Fiorinal con codeína, Flanax, Flector Patch, Flucam, Fortagesic, Gerbin, Giazo, Gladio, Goody's Back and Body Pain, Goody's Cool Orange, Goody's Extra Strength, Goody's PM, Greaseless Bengay, GW406381, HCT1026, He Xing Yi, Hyanalgese-D, HydrocoDex, ibuprofeno sódico PFIZER, ibuprofeno con paracetamol PFIZER, Icy Hot SANOFI AVENTIS, Impracor, Indocin, indometacina APP PHARMA, indometacina MYLAN, Infants' Tylenol, IP880, IP940, Iremod, ISV205, JNS013, Jr. Tylenol, Junifen, Junior Strength Advil, Junior Strength Motrin, ketoprofeno TDS, Lemsip Max, Lemsip Max All in One, Lemsip Max All Night, Lemsip Max Cold and Flu, Lialda, enjuague bucal Listerine, crema Lloyds, Lodine, Lorfit P, Loxonin, LTNS001, Mersyndol, mesalamina SALIX, mesalamina SOFAR, mesalazina, Mesasal GLAXO, Mesasal SANOFI, Mesulid, Metsal Heat Rub, Midol Complete, Midol Extended Relief, Midol Liquid Gels, Midol PM, Midol Teen Formula, Migranin comprimidos recubiertos, ML3000, Mobic, Mohrus, Motrin, Motrin Cold and Sinus Pain, Motrin PM, Movalis ASPEN, MRX7EAT, Nalfon, Nalfon PEDINOL, Naprelan, Naprosyn, Naprosyn RPG LIFE SCIENCE, naproxeno IROKO, NCX4016, NCX701, NeoProfen LUNDBECK, Nevanac, Nexcede, Niflan, Norgesic MEDICIS, Novalgin, Nuprin SCOLR, Nurofen, Nurofen Cold and Flu, Nurofen Max Strength Migraine, Nurofen Plus, Nuromol, NyQuil con vitamina C, Ocufen, OMS103HP, Oralease, Orudis ABBOTT JAPAN, Oruvail, Osteluc, Oxycodex, P54, Panadol, Panadol Actifast, Paradine, Paramax, Parfenac, Pedeo, Pennsaid, Pentasa, Pentasa ORIFARM, Peon, Percodan, Percodan-Demi, Percodex, Percogesic, Perfalgan, PL2200, PL3100, Ponstel, Prexige, Prolensa, PSD508, R-ketoprofeno, Rantudil, Relafen, Remura, Robaxisal, Rotec, Rowasa, ROX828, RP19583, RQ00317076, Rubor, Salofalk, Salonpas, Saridon, SDX101, Seltouch, sfRowasa, Shinbaro, Sinumax, Sinutab, Sinutab sinus, Spalt, Sprix, Strefen, Sudafed Cold and Cough, Sudafed Head Cold and Sinus, Sudafed PE Cold plus Cough, Sudafed PE Pressure plus Pain, Sudafed PE, Severe Cold, Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Day comprimidos, Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Night comprimidos, Sudafed PE Sinus plus Anti-inflammatory Pain Relief, Sudafed Sinus Advance, Surgam, Synalgos-DC, Synflex, Tavist allergy/sinus/headache, TDS943, TDT070, Theraflu Cold and Sore Throat, Theraflu Daytime Severe Cold and Cough, Theraflu Daytime Warming Relief, Theraflu Warming Relief Caplets Daytime Multi-Symptom Cold, Theraflu Warming Relief Cold and Chest Congestion, Thomapyrin, Thomapyrin C, Thomapyrin Effervescent, Thomapyrin Medium, Tilcotil, Tispol, Tolectin, Toradol, TPR100, TQ1011, Trauma-Salbe, Trauma-Salbe Kwizda, Treo, Treximet, Trovex, TT063, Tylenol, Tylenol Allergy Multi-Symptom, Tylenol Back Pain, Tylenol Cold & Cough Daytime, Tylenol Cold & Cough Nighttime, Tylenol Cold and Sinus Daytime, Tylenol Cold and Sinus Nighttime, Tylenol Cold Head Congestion Severe, Tylenol Cold Multi Symptom Daytime, Tylenol Cold Multi Symptom Nighttime Liquid, Tylenol Cold Multi Symptom Severe, Tylenol Cold Non-Drowsiness Formula, Tylenol Cold Severe Congestion Daytime, Tylenol Complete Cold, Cough and Flu Night time, Tylenol Flu Nighttime, Tylenol Menstrual, Tylenol PM, Tylenol Sinus Congestion & Pain Daytime, Tylenol Sinus Congestion & Pain Nighttime, Tylenol Sinus Congestion & Pain Severe, Tylenol Sinus Severe Congestion Daytime, Tylenol Ultra Relief, Tylenol con cafeína y fosfato de codeína, Tylenol con fosfato de codeína, crema Ultra Strength Bengay, Ultracet, UR8880, V0498TA01A, Vicks NyQuil Cold and Flu Relief, Vicoprofen, Vimovo, Voltaren Emulgel, Voltaren GEL, Voltaren NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH, Voltaren XR, VT122, Xefo, Xefo Rapid, Xefocam, Xibrom, XL3, Xodol, XP20B, XP21B, XP21L, Zipsor y Zoenasa. En otro aspecto, pueden identificarse inhibidores de la COX-2 a través de métodos conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, Dannhardt, G. y Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. 2001. Eur. J. Med. Chem. 36: 109-126). En algunos aspectos, se usa el inhibidor de la COX-2 para tratar o prevenir la metástasis en un paciente con cáncer de mama avanzado. En algunos aspectos, se usa el inhibidor de la COX-2 en combinación con un segundo tratamiento. En algunos aspectos, el segundo tratamiento es cualquier tratamiento descrito en el presente documento. En algunos aspectos, se usa el inhibidor de la COX-2 en combinación con un segundo tratamiento seleccionado del grupo que consiste en: denosumab, Zometa ([http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter\\_applied=true&Novald=2935376934467633633](http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&Novald=2935376934467633633); se accedió por última vez el 2/12/2012), carbozantinib o cabozantinib, anticuerpo o péptido bloqueante de PTHLH (hormona similar a la hormona paratiroidea) o PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea) y everolímús.

En otro aspecto, los agentes de tratamiento usados para evitar y/o prevenir la degradación ósea incluyen, pero no se limitan a:



- Inhibidores de la hormona paratiroidea (PTH) y hormona similar a la hormona paratiroidea (PTHLH) (incluidos los anticuerpos bloqueantes) o formas recombinantes de los mismos (teriparatida correspondiente a los aminoácidos 7-34 de la PTH). Esta hormona actúa estimulando los osteoclastos y aumentando su actividad.
- 5 – El ranelato de estroncio: es un tratamiento oral alternativo y forma parte del grupo de fármacos denominados “agentes óseos de acción dual” (DABA, por sus siglas en inglés) porque estimulan la proliferación de osteoblastos e inhiben la proliferación de osteoclastos.
- “Moduladores del receptor de estrógenos” (SERM) se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de los estrógenos al receptor, independientemente del mecanismo. Los ejemplos de moduladores del receptor de estrógenos incluyen, pero no se limitan a, estrógenos progestágenos, estradiol, droloxifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, TSE-424, tamoxifeno, idoxifeno, LY353381, LY117081, toremifeno, fluevestrant, 4,4'-dihidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenil-hidrazona de 2,2-dimetilpropanoato de 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-2H-1-benzopiran-3-il]-fenilo y SH646.
- 10
- Calcitonina: inhibe directamente la actividad osteoclástica a través del receptor de calcitonina. Los receptores de calcitonina se han identificado en la superficie de los osteoclastos.
- 15
- Bisfosfonatos: son un grupo de medicamentos usados para la prevención y el tratamiento de enfermedades con resorción y reabsorción ósea, tales como osteoporosis y cáncer con metástasis ósea, siendo este último caso con o sin hipercalcemia, asociados a cáncer de mama y a cáncer de próstata. Los ejemplos de bisfosfonatos que se pueden usar en la terapia diseñada por medio del quinto método del presente documento incluyen, aunque no se limitan a, bisfosfonatos nitrogenados (tales como pamidronato, neridronato, olpadronato, alendronato, ibandronato, risedronato, incadronato, zoledronato o ácido zoledrónico, etc.) y bisfosfonatos no nitrogenados (tales como etidronato, clodronato, tiludronato, etc.).
- 20
- “Inhibidores de la catepsina K” se refiere a compuestos que interfieren en la actividad de la catepsina K cisteína proteasa. Los ejemplos no limitativos de los inhibidores de la catepsina K incluyen los derivados de 4-amino-pirimidin-2-carbonitrilo (descritos en la solicitud de patente internacional WO 03/020278 a nombre de Novartis Pharma GMBH), pirrolo-pirimidinas descritas en la publicación WO 03/020721 (Novartis Pharma GMBH) y la publicación WO 04/000843 (ASTRAZENECA AB), así como los inhibidores descritos en las publicaciones PCT WO 00/55126 de Axys Pharmaceuticals, WO 01/49288 de Merck Frosst Canada & Co. y Axys Pharmaceuticals.
- 25
- El “inhibidor de DKK-1 (Dickkopf-1)” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que pueda reducir la actividad de DKK-1. DKK-1 es un antagonista de la ruta de Wnt soluble expresado predominantemente en el hueso adulto y regulado por incremento en pacientes con mieloma con lesiones osteolíticas. Los agentes que seleccionan como diana DKK-1 pueden desempeñar un papel en la prevención de la enfermedad ósea osteolítica en pacientes con mieloma múltiple. BHQ880 de Novartis es un anticuerpo neutralizante anti-DKK-1, completamente humano, el primero de su clase. Los estudios preclínicos apoyan la hipótesis de que BHQ880 promueve la formación de hueso y, por tanto, inhibe la enfermedad osteolítica inducida por tumor (Ettenberg S. *et al.*, Resumen de la Reunión Anual de la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer. 12 al 16 de abril de 2008; San Diego, California).
- 30
- “Inhibidor dual de MET y VEGFR2”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que sea un potente inhibidor dual de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape tumoral dirigido por MET. MET se expresa no solo en células tumorales y endoteliales, sino también en osteoblastos (células formadoras de hueso) y osteoclastos (células eliminadoras de hueso). HGF se une a MET en todos estos tipos de células, lo que otorga a la ruta de MET un papel importante en múltiples bucles autocrinos y paracrinos. La activación de MET en células tumorales parece ser importante en el establecimiento de lesiones óseas metastásicas. Al mismo tiempo, la activación de la ruta de MET en los osteoblastos y los osteoclastos puede conducir a características patológicas de las metástasis óseas, incluido el crecimiento anómalo (es decir, lesiones blásticas) o la destrucción de hueso (es decir, la lesión lítica). Por tanto, la selección como diana de la ruta de MET puede ser una estrategia viable en la prevención del establecimiento y la progresión de las lesiones óseas metastásicas. El cabozantinib (Exelixis, Inc), conocido anteriormente como XL184 (CAS 849217-68-1), es un potente inhibidor dual de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape tumoral dirigido por MET. En estudios preclínicos múltiples, se ha demostrado que el cabozantinib destruye células tumorales, reduce las metástasis e inhibe la angiogénesis (la formación de nuevos vasos sanguíneos necesaria para apoyar el crecimiento tumoral). Otros inhibidores duales adecuados son E7050 ((2R,3R)-tartrato de N-[2-fluoro-4-({2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonilaminopiridin-4-il}oxi)fenil]-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida) (CAS 928037-13-2) o foretinib (también conocido como GSK1363089, XL880, CAS 849217-64-7).
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- Los “inhibidores de RANKL” tal como se usan en el presente documento se refieren a cualquier compuesto que pueda reducir la actividad de RANK. RANKL se encuentra en la superficie de la membrana de

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

- Una proteína RANK adecuada que puede unirse a RANKL y que comprende la totalidad o un fragmento del dominio extracelular de una proteína RANK. RANK soluble puede comprender el péptido señal y el dominio extracelular de los polipéptidos RANK humanos o murinos, o alternativamente, puede usarse la forma madura de la proteína con el péptido señal eliminado.
- Osteoprotegerina o una variante de la misma con capacidad de unión a RANKL.
- Moléculas antisentido específicas de RANKL
- Ribozimas capaces de procesar los productos transcritos de RANKL.
- Anticuerpos específicos anti-RANKL. "Anticuerpo anti-RANKL o anticuerpo dirigido contra RANKL" se entiende en el presente documento como todo aquel anticuerpo que puede unirse específicamente al ligando del receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL) que inhibe una o más funciones de RANKL. Los anticuerpos pueden prepararse usando cualquiera de los métodos que conoce el experto en la técnica. Por tanto, los anticuerpos policlonales se preparan mediante la inmunización de un animal con la proteína que va a inhibirse. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Kohler, Milstein *et al.* (Nature, 1975, 256: 495). Los anticuerpos adecuados en el contexto del presente documento incluyen anticuerpos intactos que comprenden una región de unión a antígeno variable y una región constante, fragmentos "Fab", "F(ab')<sub>2</sub>" y "Fab", Fv, scFv, diacuerpos y anticuerpos biespecíficos.
- Nanocuerpos específicos anti-RANKL. Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural. La tecnología de Nanobody (nanocuerpos) se desarrolló originariamente después del descubrimiento de que los camélidos (camellos y llamas) poseen anticuerpos completamente funcionales que carecen de cadenas ligeras. La estructura general de los nanocuerpos es.

#### FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

en la que FR1 a FR4 son las regiones de marco 1 a 4, CDR1 a CDR3 son las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). Es importante destacar que el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga toda la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo de cadena pesada original. Estos dominios VHH recién descubiertos con sus propiedades estructurales y funcionales únicas forman la base de una nueva generación de anticuerpos terapéuticos que Ablynx ha denominado Nanobodies (nanocuerpos).

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

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

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

En un aspecto, se administra un antagonista de CCR5 para prevenir o inhibir la metástasis del tumor de cáncer de mama primario en hueso. En un aspecto, el antagonista de CCR5 es una molécula grande. En otro aspecto, el

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

10 En un aspecto preferido, el inhibidor dual de MET y VEGFR2 se selecciona del grupo que consiste en cabozantinib, foretinib y E7050.

En un aspecto preferido, la terapia con radio 223 es Alpharadin.

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

Método para predecir una metástasis ósea temprana en pacientes con cáncer de mama.

20 En otro aspecto, el presente documento se refiere a un método *in vitro* para determinar el riesgo de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de mama, tal como cáncer de mama HER2+, que comprende determinar el nivel de expresión del gen MAF en una muestra de dicho sujeto en el que un nivel de expresión de dicho gen por encima del valor promedio más una desviación estándar es indicativo de un riesgo aumentado de metástasis ósea temprana.

En un aspecto preferido, la metástasis ósea es una metástasis ósea muy temprana.

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

La “metástasis ósea temprana”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una metástasis ósea que aparece antes de los 5 años posteriores a la cirugía en un paciente con cáncer de mama.

25 La “metástasis ósea muy temprana”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una metástasis ósea que aparece antes de los 3 años posteriores a la cirugía en un paciente con cáncer de mama.

El cuarto método del presente documento comprende, en una primera etapa, cuantificar el nivel de expresión del gen MAF en una muestra de un sujeto que padece cáncer de mama, tal como cáncer de mama HER2+. En un aspecto preferido, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

30 En un aspecto preferido, el cuarto método del presente documento comprende cuantificar solo el nivel de expresión del gen MAF como único marcador, es decir, el método no implica determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional. Puede cuantificarse el nivel de expresión del gen MAF tal como se describió anteriormente para el primer método del presente documento.

En un aspecto preferido, el cáncer de mama es cáncer de mama HER2+.

35 En una segunda etapa, un nivel de expresión de dicho gen por encima del valor promedio más una desviación estándar es indicativo de un riesgo aumentado de metástasis ósea temprana.

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

45 La “desviación estándar” tal como se usa en el presente documento se refiere a una medida de la dispersión de una colección de números. Por ejemplo, la desviación estándar para el nivel normal promedio de MAF es la dispersión de una colección de los niveles de MAF encontrados en las muestras de tumores de mama. Cuanto más separados estén los datos, mayor es la desviación. La desviación estándar se puede obtener extrayendo la raíz cuadrada de la media de las desviaciones al cuadrado de los valores observados de su media en una distribución de frecuencia.

50 Una vez que el nivel de expresión del gen MAF en una muestra de un sujeto con cáncer de mama, tal como cáncer de mama HER2+, se ha medido y comparado con el nivel promedio, si el nivel de expresión de dicho gen está por encima del promedio más una desviación estándar con respecto al nivel promedio, entonces se puede concluir que dicho sujeto tiene una mayor tendencia a desarrollar una metástasis ósea temprana.

Método para diseñar una terapia personalizada en pacientes con cáncer de mama HER2+ con metástasis ósea

En otro aspecto, el presente documento se refiere a un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto con cáncer de mama HER2+ con metástasis ósea (a continuación en el presente documento, quinto método del presente documento) que comprende

i) cuantificar el nivel de expresión del gen MAF en una muestra de metástasis ósea de dicho sujeto y

5 ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa (i) con un valor de referencia,

en el que si el nivel de expresión del gen MAF está aumentado con respecto a dicho valor de referencia, dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia destinada a prevenir la degradación ósea.

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

10 El quinto método del presente documento comprende, en una primera etapa, cuantificar el nivel de expresión del gen MAF (o la translocación o amplificación de MAF) en una muestra en un sujeto que padece cáncer de mama HER2+. En el caso del quinto método del presente documento, la muestra puede ser una muestra de tejido de metástasis ósea.

15 En un aspecto preferido, el quinto método del presente documento comprende cuantificar solo el nivel de expresión del gen MAF como único marcador, es decir, el método no implica determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional.

20 En una segunda etapa, el nivel de expresión del gen MAF (o la translocación o amplificación de MAF) obtenido en la muestra de tumor del sujeto se compara con el valor de referencia. En un aspecto preferido, el valor de referencia es el nivel de expresión del gen MAF en una muestra de control. Dependiendo del tipo de tumor que vaya a analizarse, la naturaleza exacta de la muestra de control puede variar. Por tanto, en el caso que implica el quinto método del presente documento, entonces la muestra de referencia es una muestra de un sujeto con cáncer de mama HER2+ que no ha experimentado metástasis o que corresponde a la mediana de valores del nivel de expresión del gen MAF medido en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de mama HER2+ que no han experimentado metástasis.

25 Una vez que el nivel de expresión del gen MAF en la muestra se mide y se compara con el valor de referencia (por ejemplo, el nivel de expresión del gen MAF de una muestra de control), si el nivel de expresión de dicho gen está aumentado con respecto al valor de referencia, esto es indicativo de que dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia que tiene como objetivo evitar o prevenir la degradación ósea.

Los ejemplos ilustrativos de agentes usados para evitar y/o prevenir la degradación ósea incluyen, aunque no se limitan a:

- 30
- Inhibidores de la hormona paratiroidea (PTH) y hormona similar a la hormona paratiroidea (PTH/LH) (incluidos los anticuerpos bloqueantes) o formas recombinantes de los mismos (teriparatida correspondiente a los aminoácidos 7-34 de la PTH). Esta hormona actúa estimulando los osteoclastos y aumentando su actividad.
- 35
- El ranelato de estroncio: es un tratamiento oral alternativo y forma parte del grupo de fármacos denominados "agentes óseos de acción dual" (DABA, por sus siglas en inglés) porque estimulan la proliferación de osteoblastos e inhiben la proliferación de osteoclastos.
- 40
- "Moduladores del receptor de estrógenos" (SERM) se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de los estrógenos al receptor, independientemente del mecanismo. Los ejemplos de moduladores del receptor de estrógenos incluyen, pero no se limitan a, estrógenos progestágenos, estradiol, droloxifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, TSE-424, tamoxifeno, idoxifeno, LY353381, LY117081, toremifeno, fluevestrant, 4,4'-dihidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenil-hidrazona de 2,2-dimetilpropanoato de 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-2H-1-benzopirán-3-il]-fenilo y SH646.
- 45
- Calcitonina: inhibe directamente la actividad osteoclástica a través del receptor de calcitonina. Los receptores de calcitonina se han identificado en la superficie de los osteoclastos.
- 50
- Bisfosfonatos: son un grupo de medicamentos usados para la prevención y el tratamiento de enfermedades con resorción y reabsorción ósea, tales como osteoporosis y cáncer con metástasis ósea, siendo este último caso con o sin hipercalcemia, asociados a cáncer de mama y a cáncer de próstata. Los ejemplos de bisfosfonatos que se pueden usar en la terapia diseñada por medio del quinto método del presente documento incluyen, aunque no se limitan a, bisfosfonatos nitrogenados (tales como pamidronato, neridronato, olpadronato, alendronato, ibandronato, risedronato, incadronato, zoledronato o ácido zoledrónico, etc.) y bisfosfonatos no nitrogenados (tales como etidronato, clodronato, tiludronato, etc.).
- Alfaradin (dicloruro de radio 223). Alfaradin usa radiación alfa de la desintegración del radio 223 para destruir células cancerosas. El radio 223 selecciona como diana por sí mismo de manera natural metástasis

óseas en virtud de sus propiedades como mimético del calcio. La radiación alfa tiene un alcance muy corto de 2 a 10 células (en comparación con la radioterapia actual que se basa en la radiación beta o gamma) y, por tanto, provoca menos daño a los tejidos sanos circundantes (especialmente la médula ósea). Con propiedades similares al calcio, el radio 223 se dirige a lugares donde se usa el calcio para formar huesos en el cuerpo, incluido el sitio de crecimiento óseo anómalo y más rápido, tal como el que se observa en metástasis esqueléticas de hombres con cáncer de próstata avanzado, resistente a la castración. El radio 223, después de la inyección, se transporta en el torrente sanguíneo hasta sitios de crecimiento óseo anómalo. El lugar donde un cáncer comienza en el cuerpo se conoce como tumor primario. Algunas de estas células pueden desprenderse y ser transportadas en el torrente sanguíneo a otra parte del cuerpo. Las células cancerosas pueden asentarse entonces en esa parte del cuerpo y formar un nuevo tumor. Si esto sucede, se denomina cáncer secundario o metástasis. La mayoría de los pacientes con cáncer de próstata en estadio avanzada padecen la carga máxima de enfermedad en sus huesos. El objetivo del radio 223 es seleccionar como diana selectivamente este cáncer secundario. Cualquier radio 223 no absorbido en los huesos se enruta rápidamente hacia el intestino y se excreta.

- “Inhibidores de la catepsina K” se refiere a compuestos que interfieren en la actividad de la catepsina K cisteína proteasa. Los ejemplos no limitativos de los inhibidores de la catepsina K incluyen los derivados de 4-amino-pirimidin-2-carbonitrilo (descritos en la solicitud de patente internacional WO 03/020278 a nombre de Novartis Pharma GMBH), pirrolo-pirimidinas descritas en la publicación WO 03/020721 (Novartis Pharma GMBH) y la publicación WO 04/000843 (ASTRAZENECA AB), así como los inhibidores descritos en las publicaciones PCT WO 00/55126 de Axys Pharmaceuticals, WO 01/49288 de Merck Frosst Canada & Co. y Axys Pharmaceuticals.
- El “inhibidor de DKK-1 (Dickkopf-1)” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que pueda reducir la actividad de DKK-1. DKK-1 es un antagonista de la ruta de Wnt soluble expresado predominantemente en el hueso adulto y regulado por incremento en pacientes con mieloma con lesiones osteolíticas. Los agentes que seleccionan como diana DKK-1 pueden desempeñar un papel en la prevención de la enfermedad ósea osteolítica en pacientes con mieloma múltiple. BHQ880 de Novartis es un anticuerpo neutralizante anti-DKK-1, completamente humano, el primero de su clase. Los estudios preclínicos apoyan la hipótesis de que BHQ880 promueve la formación de hueso y, por tanto, inhibe la enfermedad osteolítica inducida por tumor (Ettenberg S. *et al.*, Resumen de la Reunión Anual de la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer. 12 al 16 de abril de 2008; San Diego, California).
- “Inhibidor dual de MET y VEGFR2”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que sea un potente inhibidor dual de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape tumoral dirigido por MET. MET se expresa no solo en células tumorales y endoteliales, sino también en osteoblastos (células formadoras de hueso) y osteoclastos (células eliminadoras de hueso). HGF se une a MET en todos estos tipos de células, lo que otorga a la ruta de MET un papel importante en múltiples bucles autocrinos y paracrinos. La activación de MET en células tumorales parece ser importante en el establecimiento de lesiones óseas metastásicas. Al mismo tiempo, la activación de la ruta de MET en los osteoblastos y los osteoclastos puede conducir a características patológicas de las metástasis óseas, incluido el crecimiento anómalo (es decir, lesiones blásticas) o la destrucción de hueso (es decir, la lesión lítica). Por tanto, la selección como diana de la ruta de MET puede ser una estrategia viable en la prevención del establecimiento y la progresión de las lesiones óseas metastásicas. El cabozantinib (Exelixis, Inc), conocido anteriormente como XL184 (CAS 849217-68-1), es un potente inhibidor dual de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape tumoral dirigido por MET. En estudios preclínicos múltiples, se ha demostrado que el cabozantinib destruye células tumorales, reduce las metástasis e inhibe la angiogénesis (la formación de nuevos vasos sanguíneos necesaria para apoyar el crecimiento tumoral). Otros inhibidores duales adecuados son E7050 ((2R,3R)-tartrato de N-[2-fluoro-4-((2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonilaminopiridin-4-il)oxi)fenil]-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida) (CAS 928037-13-2) o foretinib (también conocido como GSK1363089, XL880, CAS 849217-64-7).
- Los “inhibidores de RANKL” tal como se usan en el presente documento se refieren a cualquier compuesto que pueda reducir la actividad de RANK. RANKL se encuentra en la superficie de la membrana de osteoblastos del estroma y las células de linfocitos T, y estas células de linfocitos T son las únicas que han demostrado la capacidad de secretarlo. Su función principal es la activación de los osteoclastos, células involucradas en la resorción ósea. Los inhibidores de RANKL pueden actuar bloqueando la unión de RANKL a su receptor (RANK), bloqueando la señalización mediada por RANK o reduciendo la expresión de RANKL bloqueando la transcripción o la traducción de RANKL. Los antagonistas o inhibidores de RANKL adecuados para su uso en el presente documento incluyen, sin limitación:
  - Una proteína RANK adecuada que puede unirse a RANKL y que comprende la totalidad o un fragmento del dominio extracelular de una proteína RANK. RANK soluble puede comprender el péptido señal y el dominio extracelular de los polipéptidos RANK humanos o murinos, o alternativamente, puede usarse la forma madura de la proteína con el péptido señal eliminado.

- Osteoprotegerina o una variante de la misma con capacidad de unión a RANKL.
- Moléculas antisentido específicas de RANKL
- Ribozimas capaces de procesar los productos transcritos de RANKL.
- Anticuerpos específicos anti-RANKL. “Anticuerpo anti-RANKL o anticuerpo dirigido contra RANKL” se entiende en el presente documento como todo aquel anticuerpo que puede unirse específicamente al ligando del receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL) que inhibe una o más funciones de RANKL. Los anticuerpos pueden prepararse usando cualquiera de los métodos que conoce el experto en la técnica. Por tanto, los anticuerpos policlonales se preparan mediante la inmunización de un animal con la proteína que va a inhibirse. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Kohler, Milstein *et al.* (Nature, 1975, 256: 495). Los anticuerpos adecuados en el contexto del presente documento incluyen anticuerpos intactos que comprenden una región de unión a antígeno variable y una región constante, fragmentos “Fab”, “F(ab’)2” y “Fab”, Fv, scFv, diacuerpos y anticuerpos biespecíficos.
- Nanocuerpos específicos anti-RANKL. Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural. La tecnología de Nanobody se desarrolló originariamente después del descubrimiento de que los camélidos (camellos y llamas) poseen anticuerpos completamente funcionales que carecen de cadenas ligeras. La estructura general de los nanocuerpos es.

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

en la que FR1 a FR4 son las regiones de marco 1 a 4 CDR1 a CDR3 son las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). Es importante destacar que el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga toda la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo de cadena pesada original. Estos dominios VHH recién descubiertos con sus propiedades estructurales y funcionales únicas forman la base de una nueva generación de anticuerpos terapéuticos que Ablynx ha denominado Nanobodies.

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

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

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

En un aspecto, se administra un antagonista de CCR5 para prevenir o inhibir la metástasis del tumor de cáncer de mama primario en hueso. En un aspecto, el antagonista de CCR5 es una molécula grande. En otro aspecto, el antagonista de CCR5 es una molécula pequeña. En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es maraviroc (Velasco-Velázquez, M. *et al.* 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. 72: 3839-3850). En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es vicriviroc (Velasco-Velázquez, M. *et al.* 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. 72: 3839-3850). En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es aplaviroc (Demarest J.F. *et al.* 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. *Retrovirology* 2 (Supl. 1): S13). En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es un antagonista de CCR5 de espiropiperidina. (Rotstein D.M. *et al.* 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19 (18): 5401-5406). En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es INCB009471 (Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 4 (2): 82-7).

En un aspecto preferido, el inhibidor dual de MET y VEGFR2 se selecciona del grupo que consiste en cabozantinib, foretinib y E7050.

En un aspecto preferido, la terapia con radio 223 es Alpharadin.

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

5 Método de pronóstico de metástasis en cáncer de mama HER2+, basándose en la detección de la amplificación del gen MAF

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* (a continuación en el presente documento sexto método de la presente invención) para predecir el riesgo de metástasis ósea de un cáncer de mama HER2+, en un sujeto que padece dicho cáncer, que comprende determinar la amplificación o el número de copias del gen MAF en una muestra de cáncer de mama HER2+ de dicho sujeto con respecto a un valor de referencia en el que el número de copias aumentado o el grado de amplificación del gen MAF con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de un riesgo aumentado de desarrollar una metástasis ósea.

15 En algunas realizaciones, la amplificación está en la región en el locus 16q23. En algunas realizaciones, la amplificación está en cualquier parte de la región cromosómica entre aproximadamente el cr. 16: de aproximadamente 79.392.959 pb a aproximadamente 79.663.806 pb (desde centrómero hasta telómero). En algunas realizaciones, la amplificación está en la región genómica entre aproximadamente el cr. 16: de 79.392.959 pb a aproximadamente 79.663.806 pb, pero excluyendo los elementos de repetición de ADN. En algunas realizaciones, la amplificación se mide usando una sonda específica para esa región.

20 En una realización particular, el grado de amplificación del gen MAF se puede determinar por medio de la determinación de la amplificación de una región cromosómica que contiene dicho gen. Preferiblemente, la región cromosómica cuya amplificación es indicativa de la existencia de amplificación del gen MAF es el locus 16q22-q24 que incluye el gen MAF. El locus 16q22-q24 está ubicado en el cromosoma 16, en el brazo largo de dicho cromosoma y en un intervalo entre la banda 22 y la banda 24. Esta región se corresponde en la base de datos del NCBI con los contigios NT\_010498.15 y NT\_010542.15. En otra realización preferida, el grado de amplificación del gen MAF se puede determinar mediante el uso de una sonda específica para dicho gen. En otra realización preferida, la amplificación del gen MAF se determina mediante el uso de la sonda de fusión dual Vysis LSI IGH/MAF Dual Color, que comprende una sonda contra 14q32 y 16q23.

25 El sexto método de la presente invención comprende, en una primera etapa, determinar si el gen MAF está amplificado en una muestra de un sujeto. En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral. Para ello, se compara la amplificación del gen MAF en la muestra de tumor con respecto a una muestra de control.

30 En una realización particular, el sexto método de la presente invención para el pronóstico de la tendencia a desarrollar una metástasis ósea en un sujeto con cáncer de mama HER2+, comprende determinar el número de copias del gen MAF en una muestra de dicho sujeto y comparar dicho número de copias con el número de copias de una muestra de control o de referencia, en el que si el número de copias de MAF es mayor con respecto al número de copias de MAF de una muestra de control, entonces el sujeto tiene una mayor tendencia a desarrollar una metástasis ósea.

35 La muestra de control se refiere a una muestra de un sujeto con cáncer de mama HER2+, que no ha experimentado metástasis o que corresponde a la mediana de valores del número de copias del gen MAF medido en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de mama HER2+, respectivamente, que no han experimentado metástasis. Dicha muestra de referencia se obtiene normalmente combinando cantidades iguales de muestras de una población de sujetos. Si el número de copias del gen MAF está aumentado con respecto al número de copias de dicho gen en la muestra de control, entonces el sujeto tiene una mayor tendencia a desarrollar una metástasis.

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

similares.

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

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

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

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

25 Puede usarse cualquier molécula de marcado o marcaje que pueda unirse a un ADN para marcar las sondas usadas en el cuarto método de la presente invención, permitiendo así la detección de moléculas de ácido nucleico. Los ejemplos de etiquetas para el etiquetado incluyen, aunque no se limitan a, isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, cofactores, ligandos, agentes de quimioluminiscencia, fluoróforos, haptenos, enzimas y combinaciones de los mismos. Los métodos de marcaje y las pautas para seleccionar marcadores adecuados para diferentes propósitos se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) y Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Nueva York, 1998).

30 Una vez que se determina la existencia de la amplificación, ya sea determinando directamente la amplificación del gen MAF, la amplificación del locus 16q23 o determinando la amplificación del locus 16q22-q24, y después de compararse con la amplificación de dicho gen en el control muestra, si se detecta amplificación en el gen MAF, es indicativa del hecho de que el sujeto tiene una mayor tendencia a desarrollar una metástasis ósea.

35 La determinación de la amplificación del gen MAF debe correlacionarse con los valores de una muestra de control o una muestra de referencia que correspondan al nivel de amplificación del gen MAF medido en una muestra de un sujeto con cáncer de mama HER2+ que no ha experimentado metástasis o que corresponden a la mediana de valores de la amplificación del gen MAF medida en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de mama HER2+ que no han experimentado metástasis. Dicha muestra de referencia se obtiene normalmente combinando cantidades iguales de muestras de una población de sujetos. En general, las muestras de referencia típicas se obtendrán de sujetos que están clínicamente bien documentados y en los que la ausencia de metástasis está bien caracterizada. La colección de muestras a partir de la cual se deriva el nivel de referencia estará conformada preferiblemente por sujetos que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente objeto del estudio. Una vez que se ha establecido esta mediana de valores, el nivel de amplificación de c-MAF en los tejidos tumorales de los pacientes se puede comparar con esta mediana de valores, y por tanto, si hay amplificación, el sujeto tiene una mayor tendencia a desarrollar una metástasis.

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

55 Método de pronóstico de la metástasis en cáncer de mama HER2+ basándose en la detección de la translocación del gen MAF

En otro aspecto, el presente documento se refiere a un método *in vitro* para predecir el desenlace clínico de un paciente que padece cáncer de mama HER2+, que comprende determinar si el gen MAF está translocado en una muestra de dicho sujeto en el que una translocación del gen MAF es indicativa de un mal desenlace clínico.



En otro aspecto, el presente documento se refiere a un método *in vitro* para predecir el desenlace clínico de un paciente que padece cáncer de mama HER2+, que comprende determinar si el gen MAF está translocado en una muestra de dicho sujeto en el que una translocación del gen MAF es indicativa de un mal desenlace clínico.

- 5 En algunos aspectos, el gen translocado es de la región en el locus 16q23. En algunos aspectos, el gen translocado es de cualquier parte de la región cromosómica entre aproximadamente el cr. 16: de aproximadamente 79.392.959 pb a 79.663.806 pb (desde centrómero a telómero). En algunos aspectos, el gen translocado es de la región genómica entre aproximadamente el cr. 16: de aproximadamente 79.392.959 pb a 79.663.806 pb, pero excluyendo elementos de repetición de ADN. En algunos aspectos, la translocación se mide usando una sonda específica para esa región.
- 10 En un aspecto particular, la translocación del gen MAF se puede determinar por medio de la determinación de la translocación de una región cromosómica que contiene dicho gen. En un aspecto, la translocación es la translocación t(14,16). En otro aspecto, la región cromosómica que se transloca es del locus 16q22-q24. El locus 16q22-q24 está ubicado en el cromosoma 16, en el brazo largo de dicho cromosoma y en un intervalo entre la banda 22 y la banda 24. Esta región se corresponde en la base de datos del NCBI con los cóntigos NT\_010498.15 y NT\_010542.15. En un aspecto preferido, el gen MAF se transloca al cromosoma 14 en el locus 14q32, dando como resultado la translocación t(14,16)(q32, q23). Esta translocación coloca el gen MAF junto a los potenciadores fuertes en el locus IgH, lo que, en algunos casos, conduce a la sobreexpresión de MAF. (Eychène, A, Rocques, N. y Puoponnot, C, A New MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8: 683-693).
- 20 En un aspecto preferido, la translocación del gen MAF se puede determinar mediante el uso de una sonda específica para dicha translocación. En algunos aspectos, la translocación se mide usando una sonda de color dual. En algunos aspectos, la translocación se mide usando una sonda de fusión dual. En algunos aspectos, la translocación se mide usando una sonda de fusión dual y de color dual. En algunos aspectos, la translocación se mide usando dos sondas independientes.
- 25 En otro aspecto preferido, la translocación del gen MAF se determina usando la sonda de fusión dual Vysis LSI IGH/MAF Dual Color (<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-igh-maf-dual-color-dual-fusion-probe.html>; se accedió por última vez el 05/11/2012), que comprende una sonda contra 14q32 y 16q23. En otro aspecto preferido, la translocación del gen MAF se determina usando una sonda MAF/IgH gt(14;16) Fusion de Kreatech Diagnostics (<http://www.kreatech.com/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes/hematology/maf-igh-gt1416-fusion-probe.html>; se accedió el 05/11/2012), una sonda MAF FISH de Abnova ([http://www.abnova.com/products/products\\_detail.asp?Catalog\\_id=FA0375](http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?Catalog_id=FA0375); se accedió por última vez el 05/11/2012), una sonda de translocación de dos colores y doble fusión IGG/MAF de Cancer Genetics Italia (<http://www.cancer-geneticsitalia.com/dna-fish-probe/ighmaf/>; se accedió por última vez el 05/11/2012), una sonda IGH/MAF-t(14;16)(q32;q23) FISH de Creative Bioarray (<http://www.creative-bioarray.com/products.asp?cid=35&page=10>; se accedió por última vez el 05/11/2012), un panel de mieloma múltiple de Arup Laboratories por FISH (<http://www.aruplab.com/files/technical-bulletins/Multiple%20Myeloma%20%28MM%29%20by%20FISH.pdf>; se accedió por última vez el 05/11/2012), una sonda Agilent específica para 16q23 o 14q32 (<http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?chr=16&start=79483700&end=79754340>; se accedió por última vez el 05/11/2012; <http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?Pageid=3000&ProductID=637>; se accedió por última vez el 05/11/2012), una sonda Dako específica para 16q23 o 14q32 ([http://www.dako.com/us/ar42/psg42806000/baseproducts\\_surefish.htm?setCountry=true&url=ar42/psg42806000/baseproducts\\_surefish.htm?undefined&submit=Accept%20country](http://www.dako.com/us/ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?setCountry=true&url=ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?undefined&submit=Accept%20country); se accedió por última vez el 05/11/2012), una sonda de fusión dual, de translocación IGH/MAF de Cytocell ([http://www.zentech.be/uploads/docs/products\\_info/prenatalogy/cytocell%202012-2013%20catalogue%5B3%5D.pdf](http://www.zentech.be/uploads/docs/products_info/prenatalogy/cytocell%202012-2013%20catalogue%5B3%5D.pdf); se accedió por última vez el 05/11/2012), una sonda de fusión dual, de translocación de IGH/MAF de Metasystems XL ([http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com\\_joobdb&view=\)article&joobase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272](http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com_joobdb&view=)article&joobase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272); se accedió por última vez el 05/11/2012), un Zeiss FISH Probes XL, 100 µl, IGH/MAFB (<https://www.microshop.zeiss.com/?s=440675675dedc6&1=en&p=uk&f=r&i=5000&o=&h=25&n=1&sd=000000-0528-231-uk>; se accedió por última vez el 05/11/2012) o una sonda de fusión dual IGH/MAF de Genycell Biotech ([http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.genycell.es%2Fimages%2Fproductos%2Fchochures%2Fiphmie6\\_86.ppt&ei=MhGYUOI3GKWH0QGlt4DoDw&usq=AFQjCNEqQMbT8vQGjJbi9riEf31VgoFTTFQ&sig2=V5IS8juEMVHB18Mv2Xx\\_Ww](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.genycell.es%2Fimages%2Fproductos%2Fchochures%2Fiphmie6_86.ppt&ei=MhGYUOI3GKWH0QGlt4DoDw&usq=AFQjCNEqQMbT8vQGjJbi9riEf31VgoFTTFQ&sig2=V5IS8juEMVHB18Mv2Xx_Ww); se accedió por última vez el 05/11/2012)
- 55 En algunos aspectos, el marcador en la sonda es un fluoróforo. En algunos aspectos, el fluoróforo en la sonda es naranja. En algunos aspectos, el fluoróforo en la sonda es verde. En algunos aspectos, el fluoróforo en la sonda es rojo. En algunos casos, el fluoróforo en la sonda es amarillo. En algunos aspectos, una sonda se marca con un fluoróforo rojo y otra con un fluoróforo verde. En algunos aspectos, una sonda se marca con un fluoróforo verde y otra con un fluoróforo naranja. En algunos casos, el fluoróforo en la sonda es amarillo. Por ejemplo, si la sonda específica de MAF se marca con un fluoróforo rojo, y la sonda específica de IGH se marca con un fluoróforo verde, si se ve blanco, indica que las señales se solapan y se ha producido una translocación.
- 60

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

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

En un aspecto particular, un método del presente documento para el pronóstico de la tendencia a desarrollar una metástasis ósea en un sujeto con cáncer de mama HER2+ comprende determinar el número de copias del gen MAF en una muestra de dicho sujeto en el que el gen MAF está translocado y comparar dicho número de copias con el número de copias de una muestra de control o de referencia, en el que si el número de copias de MAF es mayor con respecto al número de copias de MAF de una muestra de control, entonces el sujeto tiene una mayor tendencia a desarrollar una metástasis ósea.

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

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

Método de pronóstico del desenlace clínico en un cáncer de mama HER2+, basándose en la detección de la amplificación del gen MAF

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* (a continuación séptimo método de la presente invención) para predecir el desenlace clínico de un paciente que padece cáncer de mama HER2+, que comprende determinar la amplificación o el número de copias del gen MAF en una muestra de cáncer de mama HER2+ de dicho sujeto en relación con un valor de referencia en el que el aumento del número de copias o el grado de amplificación del gen MAF con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de un mal desenlace clínico.

El séptimo método de la presente invención comprende, en una primera etapa, determinar si el gen MAF está amplificado en una muestra de un sujeto. La determinación de la amplificación del MAF se lleva a cabo esencialmente tal como se describe en el quinto método de la presente invención. En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral. En una realización preferida, la amplificación del gen MAF se determina mediante la determinación de la amplificación del locus 16q23 o 16q22-q24. En otra realización preferida, la amplificación del gen MAF se determina mediante el uso de una sonda específica del gen MAF.

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

En una realización preferida, el gen MAF está amplificado con respecto a un número de copias del gen de referencia cuando el número de copias del gen MAF es mayor que el número de copias que tiene una muestra de referencia o una muestra de control. En un ejemplo, se dice que el gen MAF está "amplificado" si el número de copias genómicas

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

15 En otra realización, el número de copias del gen de referencia es el número de copias del gen en una muestra de cáncer de mama HER2+, de un sujeto que no ha experimentado metástasis ósea.

En otra realización, la amplificación se determina por medio de PCR o hibridación *in situ*.

Método para diseñar una terapia personalizada en pacientes con tumores de mama HER2+

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

25 Por tanto, tal como se describe en el presente documento, dado que la amplificación o translocación del gen MAF en células de cáncer de mama HER2+ está relacionada con la presencia de metástasis ósea, la amplificación o translocación del gen MAF es útil para tomar decisiones en cuanto a la terapia más adecuada para el sujeto que padece dicho cáncer. En una realización preferida, la amplificación del gen MAF se determina mediante la determinación de la amplificación del locus 16q23 o 16q22-q24. En otra realización preferida, la amplificación del gen MAF se determina mediante el uso de una sonda específica del gen MAF.

30 Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* (a continuación en el presente documento octavo método de la presente invención) para diseñar una terapia personalizada para un sujeto que padece cáncer de mama HER2+, que comprende

i) cuantificar la amplificación o el número de copias del gen MAF en una muestra de cáncer de mama HER2+ de dicho sujeto y

ii) comparar la amplificación o el número de copias del gen obtenido en i) con un valor de referencia,

35 en el que si el número de copias o el grado de amplificación está aumentado con respecto a dicho valor de referencia, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia que tiene como objetivo prevenir y/o tratar una metástasis ósea y/o una terapia que tiene como objetivo evitar y/o prevenir la degradación ósea, en el que si el número de copias o el grado de amplificación no está aumentado con respecto a dicho valor de referencia, entonces dicho sujeto no es susceptible de recibir una terapia que tiene como objetivo prevenir y/o tratar una metástasis ósea y/o una terapia que tiene como objetivo evitar y/o prevenir la degradación ósea.

40 En una realización preferida, la amplificación del gen MAF se determina mediante la determinación de la amplificación del locus 16q23 o 16q22-q24. En otra realización preferida, la amplificación del gen MAF se determina mediante el uso de una sonda específica del gen MAF.

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

45 Otro método de la presente invención comprende cuantificar la amplificación del gen MAF en una muestra de cáncer de mama HER2+ en un sujeto que padece cáncer de mama HER2+. En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

50 En otra realización particular, el método de la presente invención comprende cuantificar solo la amplificación del gen MAF como marcador único, es decir, el método no implica determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional.

En el caso de este método particular de la presente invención, la muestra es una muestra de cáncer de mama HER2+ del sujeto.

En una segunda etapa, la amplificación del gen MAF obtenida en la muestra de tumor del sujeto se compara con un valor de referencia. En una realización preferida, el valor de referencia es la amplificación del gen MAF de dicho gen

en una muestra de control. La determinación del gen MAF debe relacionarse con los valores de una muestra de control o una muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor que vaya a analizarse, la naturaleza exacta de la muestra de control puede variar. Por tanto, preferiblemente la muestra de referencia es una muestra de un sujeto con cáncer de mama HER2+, que no ha metastatizado o que corresponde al gen MAF medido en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de mama HER2+, que no ha metastatizado.

Una vez que la amplificación del gen MAF en la muestra se ha medido y comparado con el valor de referencia, si la amplificación génica de dicho gen está aumentada con respecto al valor de referencia, se puede concluir que dicho sujeto es susceptible de recibir terapia o no recibir una terapia destinada a prevenir (si el sujeto aún ha de experimentar metástasis) y/o tratar la metástasis o no prevenir y/o tratar una metástasis (si el sujeto ya ha experimentado metástasis).

Cuando el cáncer ha metastatizado, pueden usarse tratamientos sistémicos incluyendo pero sin limitarse a, quimioterapia, tratamiento hormonal, inmunoterapia o una combinación de los mismos. Adicionalmente, puede usarse radioterapia y/o cirugía. La elección del tratamiento depende generalmente del tipo de cáncer primario, el tamaño, la ubicación de la metástasis, la edad, la salud general del paciente y los tipos de tratamientos usados anteriormente.

Los tratamientos sistémicos son aquellos que llegan a todo el cuerpo y representan terapias que tienen como objetivo prevenir (si el sujeto aún ha de experimentar metástasis) y/o tratar la metástasis (si el sujeto ya ha experimentado metástasis), como:

- La quimioterapia es el uso de medicamentos para destruir células cancerosas. Los medicamentos se administran generalmente por vía oral o intravenosa. A veces, la quimioterapia se usa junto con radioterapia. Los tratamientos quimioterápicos adecuados para el cáncer de mama incluyen, sin limitación, antraciclinas (doxorubicina, epirubicina, doxorubicina liposomal pegilada), taxanos (paclitaxel, docetaxel, paclitaxel unido a nanopartícula de albúmina), 5-fluorouracilo (5-FU en infusión continua, capecitabina) alcaloides de vinca (vinorelbina, vinblastina), gemcitabina, sales de platino (cisplatino, carboplatino), ciclofosfamida, etopósido y combinaciones de uno o más de los anteriores, tales como regímenes de ciclofosfamida/antraciclina +/- 5-fluorouracilo (tales como doxorubicina/ciclofosfamida (AC), epirubicina/ciclofosfamida, (EC) ciclofosfamida/epirubicina/5-fluorouracilo (CEF), ciclofosfamida/doxorubicina/5-fluorouracilo (CAF), 5-fluorouracilo/epirubicina/ciclofosfamida (FEC)), ciclofosfamida/metotrexato/5-fluorouracilo (CMF), antraciclinas/taxanos (tales como doxorubicina/paclitaxel o doxorubicina/docetaxel), docetaxel/capecitabina, gemcitabina/paclitaxel, regímenes de taxano/platino (tales como paclitaxel/carboplatino o docetaxel/carboplatino).
- La inmunoterapia es un tratamiento que ayuda al sistema inmunitario del paciente a combatir el cáncer. Existen varios tipos de inmunoterapia que se usan para tratar la metástasis en los pacientes. Estos incluyen, pero no se limitan a, citocinas, anticuerpos monoclonales y vacunas antitumorales.

En otro aspecto, el tratamiento es Alfaradin (dicloruro de radio 223). Alfaradin usa radiación alfa de la desintegración del radio 223 para destruir células cancerosas. El radio 223 selecciona como diana por sí mismo de manera natural una metástasis ósea en virtud de sus propiedades como mimético del calcio. La radiación alfa tiene un alcance muy corto de 2 a 10 células (en comparación con la radioterapia actual que se basa en la radiación beta o gamma) y, por tanto, provoca menos daño a los tejidos sanos circundantes (especialmente la médula ósea). Con propiedades similares al calcio, el radio 223 se dirige a lugares donde se usa el calcio para formar huesos en el cuerpo, incluido el sitio de crecimiento óseo anómalo y más rápido, tal como el que se observa en metástasis esqueléticas de hombres con cáncer de próstata avanzado, resistente a la castración. El radio 223, después de la inyección, se transporta en el torrente sanguíneo hasta sitios de crecimiento óseo anómalo. El lugar donde un cáncer comienza en el cuerpo se conoce como tumor primario. Algunas de estas células pueden desprenderse y ser transportadas en el torrente sanguíneo a otra parte del cuerpo. Las células cancerosas pueden asentarse entonces en esa parte del cuerpo y formar un nuevo tumor. Si esto sucede, se denomina cáncer secundario o metástasis. La mayoría de los pacientes con cáncer de próstata en estadio avanzado padecen la carga máxima de enfermedad en sus huesos. El objetivo del radio 223 es seleccionar como diana selectivamente este cáncer secundario. Cualquier cantidad de radio 223 no absorbida en los huesos se encamina rápidamente hacia el intestino y se excreta.

En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de mTor. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor es un inhibidor dual de mTor/cinasa PI3. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para prevenir o inhibir la metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se selecciona del grupo que consiste en: ABI009 (sirolimús), rapamicina (sirolimús), Abraxane (paclitaxel), Absorb (everolimús), Afinitor (everolimús), Afinitor con Gleevec, AS703026 (pimasertib), Axxess (umirolimús), AZD2014, BEZ235, Biofreedom (umirolimús), BioMatrix (umirolimús), BioMatrix flex (umirolimús), CC115, CC223, endoprótesis farmacoactiva de sirolimús de bioingeniería combinada ORBUSNEICH (sirolimús), Curaxin CBLC102 (mepacrina), DE109 (sirolimús), DS3078, Endeavour DES (zotarolimús), Endeavor Resolute (zotarolimús), Femara (letrozol), Hocena (antroquinonol), INK128, Inspiron (sirolimús), IPI504 (clorhidrato de retaspimicina), KRN951 (tivozanib), ME344, MGA031 (teplizumab), MiStent SES (sirolimús), MKC1, Nobori (umirolimús), OSI027, OVI123 (cordicepina), Palomid 529, PF04691502, Promus Element (everolimús), PWT33597, Rapamune (sirolimús), Resolute DES (zotarolimús), RG7422, SAR245409, SF1126,

SGN75 (vorsetuzumab mafodotina), Synergy (everolímús), Taltorvic (ridaforolímús), Tarceva (erlotinib), Torisel (temsirolímús), Xience Prime (everolímús), Xience V (everolímús), Zomaxx (zotarolímús), Zortress (everolímús), endoprótesis periférica farmacóactiva de zotarolímús MEDTRONIC (zotarolímús), AP23841, AP24170, ARmTOR26, BN107, BN108, canstatina GENZYME (canstatina), CU906, EC0371, EC0565, KI1004, LOR220, NV128, rapamicina ONCOIMMUNE (sirolímús), SB2602, sirolímús PNP SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS (sirolímús), TOP216, VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, Advacan (everolímús), AZD8055, endoprótesis coronaria farmacóactiva de sirolímús Cypher Select Plus (sirolímús), endoprótesis coronaria farmacóactiva de sirolímús Cypher (sirolímús), balón recubierto de fármaco (sirolímús), E-Magic Plus (sirolímús), Emtor (sirolímús), Esprit (everolímús) Évertor (everolímús), HBF0079, LCP-Siro (sirolímús), Limus CLARIS (sirolímús), inhibidor de mTOR CELLZOME, endoprótesis coronaria farmacóactiva de sirolímús Nevo (sirolímús), nPT-mTOR, Rapacan (sirolímús), Renacept (sirolímús), ReZolve (sirolímús), Rocas (sirolímús), SF1126, Sirolim (sirolímús), sirolímús NORTH CHINA (sirolímús), sirolímús RANBAXY (sirolímús), sirolímús WATSON (sirolímús) Siropan (sirolímús), Sirova (sirolímús), Supralimus (sirolímús), Supralimus-Core (sirolímús), tacrolímús WATSON (tacrolímús), TAF A93, temsirolímús ACCORD (temsirolímús), temsirolímús SANDOZ (temsirolímús), TOP216, Xience Prime (everolímús), Xience V (everolímús).

En un aspecto específico, el inhibidor de mTor es Afinitor (everolímús) ([http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter\\_applied=true&Novald=4029462064338207963](http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&Novald=4029462064338207963); se accedió por última vez el 28/11/2012). En otro aspecto, se combina everolímús con un inhibidor de la aromatasa. (Véase, por ejemplo, Baselga, J, *et al.*, Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366(6): 520-529). En otro aspecto, pueden identificarse inhibidores de mTor a través de métodos conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Zhou, H. *et al.* Updates for mTor inhibitors. 2010. Anticancer Agents Med. Chem. 10 (7): 571-81). En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para tratar, prevenir o inhibir la metástasis en un paciente que es positivo para un receptor hormonal. (Véase, por ejemplo, Baselga, J, *et al.*, Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366(6): 520-529). En algunas realizaciones, el paciente es ER+. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para tratar, prevenir o inhibir la metástasis en un paciente con cáncer de mama avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa en combinación con un segundo tratamiento. En algunos aspectos, el segundo tratamiento es cualquier tratamiento descrito en el presente documento.

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

En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de la COX-2. En algunos aspectos, el inhibidor de la COX-2 se usa para prevenir o inhibir la metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de la COX-2 se selecciona del grupo: ABT963, paracetamol ER JOHNSON (paracetamol), Acular X (ketorolaco trometamina), BAY1019036 (aspirina), BAY987111 (difenhidramina, naproxeno sódico), BAY11902 (piroxicam), BCIBUH001 (ibuprofeno), Capoxigem (apricoxib), CS502, CS670 (pelubiprofeno), diclofenaco HPBCD (diclofenaco), Diractin (ketoprofeno), GW406381, HCT1026 (nitroflurbiprofeno), Hyanalgese-D (diclofenaco), HydrocoDex (paracetamol, dextrometorfano, hidrocodona), ibuprofeno sódico PFIZER (ibuprofeno sódico), ibuprofeno con paracetamol PFIZER (paracetamol, ibuprofeno), Impracor (ketoprofeno), IP880 (diclofenaco), IP940 (indometacina), ISV205 (diclofenaco sódico), JNS013 (paracetamol, clorhidrato de tramadol), ketoprofeno TDS (ketoprofeno), LTNS001 (naproxeno etemesil), mesalamina SALIX (mesalamina), mesalamina SOFAR (mesalamina), mesalazina (mesalamina), ML3000 (licofelona), MRX7EAT (etodolaco), naproxeno IROKO (naproxeno), NCX4016 (nitroaspirina), NCX701 (nitroparacetamol), Nuprin SCOLR (ibuprofeno), OMS103HP (clorhidrato de amitriptilina, ketoprofeno, clorhidrato de oximetazolina), Oralease (diclofenaco), OxycoDex (dextrometorfano, oxicodona), P54, Perco-Dex (paracetamol, dextrometorfano, oxicodona), PL3100 (naproxeno, fosfatidilcolina), PSD508, R-ketoprofeno (ketoprofeno), Remura (bromfenaco sódico), ROX828 (ketorolaco trometamina), RP19583 (ketoprofeno lisina), RQ00317076, SDX101 (R-etodolaco), TDS943 (diclofenaco sódico), TDT070 (ketoprofeno), TPR100, TQ1011 (ketoprofeno), TT063 (S-flurbiprofeno), UR8880 (cimicoxib), V0498TA01A (ibuprofeno), VT122 (etodolaco, propanolol), XP20B (paracetamol, dextropropoxifeno), XP21B (diclofenaco potásico), XP21L (diclofenaco potásico), Zoenasa (acetilcisteína, mesalamina), Acephen, Actifed Plus, Actifed-P, Acular, Acular LS, Acular PF, Acular X, Acuvail, Advil, Advil Allergy Sinus, Advil Cold and Sinus, Advil Congestion Relief, Advil PM, Advil PM Capsule, Air Salonpas, Airtal, Alcohol-Free NyQuil Cold & Flu Relief, Aleve, Aleve ABDI IBRAHIM, Aleve-D, Alka-Seltzer, Alka-Seltzer BAYER, Alka-Seltzer

Extra Strength, Alka-Seltzer Lemon-Lime, Alka-Seltzer Original, Alka-Seltzer Plus, Alka-Seltzer plus Cold and Cough, Alka-Seltzer plus Cold and Cough Formula, Alka-Seltzer Plus Day and Night Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Day Non-Drowsy Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Flu Formula, Alka-Seltzer Plus Night Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Sinus Formula, Alka-Seltzer Plus Sparkling Original Cold Formula, Alka-Seltzer PM, Alka-Seltzer Wake-Up Call,

5 Anacin, Anaprox, Anaprox MINERVA, Ansaid, apitoxina, Apranax, Apranax abdi, Arcoxia, Arthritis Formula Bengay, Arthrotec, Asacol, Asacol HD, Asacol MEDUNA ARZNEIMITTEL, Asacol ORIFARM, aspirina BAYER, complejo de aspirina, aspirina Migran, AZD3582, Azulfidina, Baralgan M, BAY1019036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001, Benadryl Allergy, Benadryl Day and Night, Benylin 4 Flu, Benylin Cold and Flu, Benylin Cold and Flu Day and Night, Benylin Cold and Sinus Day and Night, Benylin Cold and Sinus Plus, Benylin Day and Night Cold and Flu Relief,

10 Benylin1 All-In-One, Brexin, Brexin ANGELINI, Bromday, Bufferin, Buscopan Plus, Caldolor, Calmatel, Cambia, Canasa, Capoxigem, Cataflam, Celebrex, Celebrex ORIFARM, Children's Advil Allergy Sinus, Children's Tylenol, Children's Tylenol Cough and Runny Nose, Children's Tylenol plus cold, Children's Tylenol plus Cold and Cough, Children's Tylenol plus cold and stuffy nose, Children's Tylenol plus Flu, Children's Tylenol plus cold & allergy, Children's Tylenol plus Cough & Runny Nose, Children's Tylenol plus Cough & Sore Throat, Children's Tylenol plus multi symptom cold, Clinoril, Codral Cold and Flu, Codral Day and Night Day comprimidos, Codral Day and Night Night comprimidos, Codral Nighttime, Colazal, Combunox, Contac Cold plus Flu, Contac Cold plus Flu Non-Drowsy, Coricidin D, Coricidin HBP Cold and Flu, Coricidin HBP Day and Night Multi-Symptom Cold, Coricidin HBP Maximum Strength Flu, Coricidin HBP Nighttime Multi-Symptom Cold, Coricidin II Extra Strength Cold and Flu, CS502, CS670, Daypro, Daypro Alta, DDS06C, Demazin Cold and Flu, Demazin Cough, Cold and Flu, Demazin day/night Cold and Flu, Demazin PE Cold and Flu, Demazin PE day/night Cold and Flu, diclofenaco HPBCD, Dimetapp Day Relief, Dimetapp Multi-Symptom Cold and Flu, Dimetapp Night Relief, Dimetapp Pain and Fever Relief, Dimetapp PE Sinus Pain, Dimetapp PE Sinus Pain plus Allergy, Dipentum, Diractin, Disprin Cold 'n' Fever, Disprin Extra, Disprin Forte, Disprin Plus, Dristan Cold, Dristan Junior, Drixoral Plus, Duexis, Dynastat, Efferalgan, Efferalgan Plus Vitamin C, Efferalgan Vitamin C, Elixsure IB, Excedrin Back and Body, Excedrin Migraine, Excedrin PM, Excedrin Sinus Headache, Excedrin Tension Headache, Falcol, Fansamac, Feldene, FeverAll, Fiorinal, Fiorinal con codeína, Flanax, Flector Patch, Flucam, Fortagesic, Gerbin, Giazo, Gladio, Goody's Back and Body Pain, Goody's Cool Orange, Goody's Extra Strength, Goody's PM, Greaseless Bengay, GW406381, HCT1026, He Xing Yi, Hyanalgese-D, HydrocoDex, ibuprofeno sódico PFIZER, ibuprofeno con paracetamol PFIZER, Icy Hot SANOFI AVENTIS, Impracor, Indocin, indometacina APP PHARMA, indometacina MYLAN, Infants' Tylenol, IP880, IP940, Iremod, ISV205,

30 JNS013, Jr. Tylenol, Junifen, Junior Strength Advil, Junior Strength Motrin, ketoprofeno TDS, Lemsip Max, Lemsip Max All in One, Lemsip Max All Night, Lemsip Max Cold and Flu, Lialda, enjuague bucal Listerine, crema Lloyds, Lodine, Lorfit P, Loxonin, LTNS001, Mersyndol, mesalamina SALIX, mesalamina SOFAR, mesalazina, Mesasal GLAXO, Mesasal SANOFI, Mesulid, Metsal Heat Rub, Midol Complete, Midol Extended Relief, Midol Liquid Gels, Midol PM, Midol Teen Formula, Migranin comprimidos recubiertos, ML3000, Mobic, Mohrus, Motrin, Motrin Cold and Sinus Pain, Motrin PM, Movalis ASPEN, MRX7EAT, Nalfon, Nalfon PEDINOL, Naprelan, Naprosyn, Naprosyn RPG LIFE SCIENCE, naproxeno IROKO, NCX4016, NCX701, NeoProfen LUNDBECK, Nevanac, Nexcede, Niflan, Norgesic MEDICIS, Novalgin, Nuprin SCOLR, Nurofen, Nurofen Cold and Flu, Nurofen Max Strength Migraine, Nurofen Plus, Nuromol, NyQuil con vitamina C, Ocufen, OMS103HP, Oralease, Orudis ABBOTT JAPAN, Oruvail, Osteluc, Oxycodex, P54, Panadol, Panadol Actifast, Paradine, Paramax, Parfenac, Pedeo, Pennsaid, Pentasa, Pentasa ORIFARM, Peon, Percodan, Percodan-Demi, Percodex, Percogesic, Perfalgan, PL2200, PL3100, Ponstel, Prexige, Prolensa, PSD508, R-ketoprofeno, Rantudil, Relafen, Remura, Robaxisal, Rotec, Rowasa, ROX828, RP19583, RQ00317076, Rubor, Salofalk, Salonpas, Saridon, SDX101, Seltouch, sfRowasa, Shinbaro, Sinumax, Sinutab, Sinutab sinus, Spalt, Sprix, Strefen, Sudafed Cold and Cough, Sudafed Head Cold and Sinus, Sudafed PE Cold plus Cough, Sudafed PE Pressure plus Pain, Sudafed PE, Severe Cold, Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Day comprimidos, Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Night comprimidos, Sudafed PE Sinus plus Anti-inflammatory Pain Relief, Sudafed Sinus Advance, Surgam, Synalgos-DC, Synflex, Tavist allergy/sinus/headache, TDS943, TDT070, Theraflu Cold and Sore Throat, Theraflu Daytime Severe Cold and Cough, Theraflu Daytime Warming Relief, Theraflu Warming Relief Caplets Daytime Multi-Symptom Cold, Theraflu Warming Relief Cold and Chest Congestion, Thomapyrin, Thomapyrin C, Thomapyrin Effervescent, Thomapyrin Medium, Tilcotil, Tispol, Tolectin, Toradol, TPR100, TQ1011, Trauma-Salbe, Trauma-Salbe Kwizda, Treo, Treximet, Trovex, TT063, Tylenol, Tylenol Allergy Multi-Symptom, Tylenol Back Pain, Tylenol Cold & Cough Daytime, Tylenol Cold & Cough Nighttime, Tylenol Cold and Sinus Daytime, Tylenol Cold and Sinus Nighttime, Tylenol Cold Head Congestion Severe, Tylenol Cold Multi Symptom Daytime, Tylenol Cold Multi Symptom Nighttime Liquid, Tylenol Cold Multi Symptom Severe, Tylenol Cold Non-Drowsiness Formula, Tylenol Cold Severe Congestion Daytime, Tylenol Complete Cold, Cough and Flu Night time, Tylenol Flu Nighttime, Tylenol Menstrual, Tylenol PM, Tylenol Sinus Congestion & Pain Daytime, Tylenol Sinus Congestion & Pain Nighttime, Tylenol Sinus Congestion & Pain Severe, Tylenol Sinus Severe Congestion Daytime, Tylenol Ultra Relief, Tylenol con cafeína y fosfato de codeína, Tylenol con fosfato de codeína, crema Ultra Strength Bengay, Ultracet, UR8880, V0498TA01A, Vicks NyQuil Cold and Flu Relief, Vicoprofen, Vimovo, Voltaren Emulgel, Voltaren GEL, Voltaren NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH, Voltaren XR, VT122, Xefo, Xefo Rapid, Xefocam, Xibrom, XL3, Xodol, XP20B, XP21B, XP21L, Zipsor, y Zoenasa. En otro aspecto, pueden identificarse inhibidores de la COX-2 a través de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Dannhardt, G. y Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors -current status and future prospects. 2001. Eur. J. Med. Chem. 36: 109-126). En algunos aspectos, se usa el inhibidor de la COX-2 para tratar o prevenir la metástasis en un paciente con cáncer de mama avanzado. En algunos aspectos, se usa el inhibidor de la COX-2 en combinación con un segundo tratamiento. En algunos aspectos, el segundo tratamiento es cualquier tratamiento descrito en el presente documento. En algunos aspectos, se usa el inhibidor de la COX-2 en combinación con un segundo

tratamiento seleccionado del grupo que consiste en: denosumab, Zometa ([http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter\\_applied=true&Novald=2935376934467633633](http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&Novald=2935376934467633633); se accedió por última vez el 02/12/2012), carbozantinib o cabozantinib, anticuerpo o péptido bloqueante de PTHLH (hormona similar a la hormona paratiroidea) o PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea) y everolímús.

5 En otro aspecto, los agentes de tratamiento usados para evitar y/o prevenir la degradación ósea incluyen, aunque no se limitan a:

- 10
  - Inhibidores de la hormona paratiroidea (PTH) y hormona similar a la hormona paratiroidea (PTHLH) (incluidos los anticuerpos bloqueantes) o formas recombinantes de los mismos (teriparatida correspondiente a los aminoácidos 7-34 de la PTH). Esta hormona actúa estimulando los osteoclastos y aumentando su actividad.
- 15
  - El ranelato de estroncio: es un tratamiento oral alternativo y forma parte del grupo de fármacos denominados “agentes óseos de acción dual” (DABA, por sus siglas en inglés) porque estimulan la proliferación de osteoblastos e inhiben la proliferación de osteoclastos.
  - “Moduladores del receptor de estrógenos” (SERM) se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de los estrógenos al receptor, independientemente del mecanismo. Los ejemplos de moduladores del receptor de estrógenos incluyen, pero no se limitan a, estrógenos progestágenos, estradiol, droloxifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, TSE-424, tamoxifeno, idoxifeno, LY353381, LY117081, toremifeno, fluevestrant, 4,4'-dihidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenil-hidrazona de 2,2-dimetilpropanoato de 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-2H-1-benzopiran-3-il]-fenilo y SH646.
- 20
  - Calcitonina: inhibe directamente la actividad osteoclástica a través del receptor de calcitonina. Los receptores de calcitonina se han identificado en la superficie de los osteoclastos.
  - Bisfosfonatos: son un grupo de medicamentos usados para la prevención y el tratamiento de enfermedades con resorción y reabsorción ósea, tales como osteoporosis y cáncer con metástasis ósea, siendo este último caso con o sin hipercalcemia, asociados a cáncer de mama y a cáncer de próstata. Los ejemplos de bisfosfonatos que pueden usarse en la terapia diseñada por medio del octavo método de la presente invención incluyen, aunque no se limitan a, bisfosfonatos nitrogenados (tales como pamidronato, neridronato, olpadronato, alendronato, ibandronato, risedronato, incadronato, zoledronato o ácido zoledrónico, etc.) y bisfosfonatos no nitrogenados (tales como etidronato, clodronato, tiludronato, etc.).
- 25
  - “Inhibidores de la catepsina K” se refiere a compuestos que interfieren en la actividad de la catepsina K cisteína proteasa. Los ejemplos no limitativos de los inhibidores de la catepsina K incluyen los derivados de 4-amino-pirimidin-2-carbonitrilo (descritos en la solicitud de patente internacional WO 03/020278 a nombre de Novartis Pharma GMBH), pirrolo-pirimidinas descritas en la publicación WO 03/020721 (Novartis Pharma GMBH) y la publicación WO 04/000843 (ASTRAZENECA AB), así como los inhibidores descritos en las publicaciones PCT WO 00/55126 de Axys Pharmaceuticals, WO 01/49288 de Merck Frosst Canada & Co. y Axys Pharmaceuticals.
- 30
  - El “inhibidor de DKK-1 (Dickkopf-1)” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que pueda reducir la actividad de DKK-1. DKK-1 es un antagonista de la ruta de Wnt soluble expresado predominantemente en el hueso adulto y regulado por incremento en pacientes con mieloma con lesiones osteolíticas. Los agentes que seleccionan como diana DKK-1 pueden desempeñar un papel en la prevención de la enfermedad ósea osteolítica en pacientes con mieloma múltiple. BHQ880 de Novartis es un anticuerpo neutralizante anti-DKK-1, completamente humano, el primero de su clase. Los estudios preclínicos apoyan la hipótesis de que BHQ880 promueve la formación de hueso y, por tanto, inhibe la enfermedad osteolítica inducida por tumor (Ettenberg S. *et al.*, Resumen de la Reunión Anual de la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer. 12 al 16 de abril de 2008; San Diego, California).
- 35
  - “Inhibidor dual de MET y VEGFR2”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que sea un potente inhibidor dual de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape tumoral dirigido por MET. MET se expresa no solo en células tumorales y endoteliales, sino también en osteoblastos (células formadoras de hueso) y osteoclastos (células eliminadoras de hueso). HGF se une a MET en todos estos tipos de células, lo que otorga a la ruta de MET un papel importante en múltiples bucles autocrinos y paracrinos. La activación de MET en células tumorales parece ser importante en el establecimiento de lesiones óseas metastásicas. Al mismo tiempo, la activación de la ruta de MET en los osteoblastos y los osteoclastos puede conducir a características patológicas de las metástasis óseas, incluido el crecimiento anómalo (es decir, lesiones blásticas) o la destrucción de hueso (es decir, la lesión lítica. Por tanto, la selección como diana de la ruta de MET puede ser una estrategia viable en la prevención del establecimiento y la progresión de las lesiones óseas metastásicas. El cabozantinib (Exelixis, Inc), conocido anteriormente como XL184 (CAS 849217-68-1), es un potente inhibidor dual de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape tumoral dirigido por MET. En estudios preclínicos

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

- Los “inhibidores de RANKL” tal como se usan en el presente documento se refieren a cualquier compuesto que pueda reducir la actividad de RANK. RANKL se encuentra en la superficie de la membrana de osteoblastos del estroma y las células de linfocitos T, y estas células de linfocitos T son las únicas que han demostrado la capacidad de secretarlo. Su función principal es la activación de los osteoclastos, células involucradas en la resorción ósea. Los inhibidores de RANKL pueden actuar bloqueando la unión de RANKL a su receptor (RANK), bloqueando la señalización mediada por RANK o reduciendo la expresión de RANKL bloqueando la transcripción o la traducción de RANKL. Los antagonistas o inhibidores de RANKL adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación:
  - Una proteína RANK adecuada que puede unirse a RANKL y que comprende la totalidad o un fragmento del dominio extracelular de una proteína RANK. RANK soluble puede comprender el péptido señal y el dominio extracelular de los polipéptidos RANK humanos o murinos, o alternativamente, puede usarse la forma madura de la proteína con el péptido señal eliminado.
  - Osteoprotegerina o una variante de la misma con capacidad de unión a RANKL.
  - Moléculas antisentido específicas de RANKL
  - Ribozimas que pueden procesar los productos transcritos de RANKL.
  - Anticuerpos específicos anti-RANKL. “Anticuerpo anti-RANKL o anticuerpo dirigido contra RANKL” se entiende en el presente documento como todo aquel anticuerpo que puede unirse específicamente al ligando del receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL) que inhibe una o más funciones de RANKL. Los anticuerpos pueden prepararse usando cualquiera de los métodos que conoce el experto en la técnica. Por tanto, los anticuerpos policlonales se preparan mediante la inmunización de un animal con la proteína que va a inhibirse. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Kohler, Milstein *et al.* (Nature, 1975, 256: 495). Los anticuerpos adecuados en el contexto de la presente invención incluyen anticuerpos intactos que comprenden una región de unión a antígeno variable y una región constante, fragmentos “Fab”, “F(ab')<sub>2</sub>” y “Fab”, Fv, scFv, diacuerpos y anticuerpos biespecíficos.
  - Nanocuerpos específicos anti-RANKL. Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural. La tecnología de Nanobody se desarrolló originariamente después del descubrimiento de que los camélidos (camellos y llamas) poseen anticuerpos completamente funcionales que carecen de cadenas ligeras. La estructura general de los nanocuerpos es.

#### FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

en la que FR1 a FR4 son las regiones de marco 1 a 4, CDR1 a CDR3 son las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). Es importante destacar que el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga toda la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo de cadena pesada original. Estos dominios VHH recién descubiertos con sus propiedades estructurales y funcionales únicas forman la base de una nueva generación de anticuerpos terapéuticos que Ablynx ha denominado Nanobodies.

En una realización, el inhibidor de RANKL se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo específico de RANKL, un nanocuerpo específico de RANKL y osteoprotegerina. En una realización específica, el anticuerpo anti-RANKL es un anticuerpo monoclonal. En una realización aún más específica, el anticuerpo anti-RANKL es denosumab (Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3): 210-215, número CAS 615258-40-7). Denosumab es un anticuerpo monoclonal completamente humano que se une al RANKL y evita su activación (no se une al receptor RANK). Diversos aspectos de denosumab están cubiertos por las patentes estadounidenses n.ºs 6.740.522; 7.411.050; 7.097.834; 7.364.736. En otra realización, el inhibidor de RANKL es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o constructo de fusión que se une al mismo epítipo que el denosumab.

En una realización preferida, el nanocuerpo anti-RANKL es cualquiera de los nanocuerpos tal como se describe en el documento WO2008142164. En una realización todavía más preferida, el anticuerpo anti-RANKL es el ALX-0141 (Ablynx). ALX-0141 ha sido diseñado para inhibir la pérdida ósea asociada con la osteoporosis posmenopáusica, la artritis reumatoide, el cáncer y determinados medicamentos, y para restablecer el equilibrio del metabolismo óseo sano.



En una realización preferida, el agente que previene la degradación ósea se selecciona del grupo que consiste en un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, un inhibidor de PTH y PTHLH o un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor dual de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógenos, radio 223, calcitonina y un inhibidor de la catepsina K. En una realización más preferida, el agente que previene la degradación ósea es un bisfosfonato. En una realización aún más preferida, el bisfosfonato es el ácido zoledrónico.

En un aspecto, se administra un antagonista de CCR5 para prevenir o inhibir la metástasis del tumor de cáncer de mama primario en hueso. En una realización, el antagonista de CCR5 es una molécula grande. En otra realización, el antagonista de CCR5 es una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el antagonista de CCR5 es maraviroc (Velasco-Velázquez, M. *et al.* 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. 72: 3839-3850). En algunas realizaciones, el antagonista de CCR5 es vicriviroc. Velasco-Velázquez, M. *et al.* 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. 72: 3839-3850). En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es aplaviroc (Demarest J.F. *et al.* 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. *Retrovirology* 2 (Supl. 1): S13). En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es un antagonista de CCR5 de espiropiperidina. (Rotstein D.M. *et al.* 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19 (18): 5401-5406. En algunas realizaciones, el antagonista de CCR5 es INCB009471 (Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 4 (2): 82-7).

En una realización preferida, el inhibidor dual de MET y VEGFR2 se selecciona del grupo que consiste en cabozantinib, foretinib y E7050.

En una realización preferida, la terapia con radio 223 es Alpharadin.

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

#### Métodos para tratar la metástasis ósea de cáncer de mama HER2+, usando agentes inhibidores de c-Maf

En otro aspecto, el presente documento se refiere a un agente inhibidor de c-Maf (a continuación en el presente documento, agente inhibidor del presente documento) para su uso en el tratamiento o la prevención de una metástasis ósea de cáncer de mama HER2+.

En otro aspecto, el presente documento se refiere al uso de un agente inhibidor de c-Maf para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una metástasis ósea de cáncer de mama HER2+.

En otro aspecto, el presente documento se refiere a un método para el tratamiento o la prevención de una metástasis ósea de cáncer de mama HER2+ en un sujeto que lo necesite que comprende la administración a dicho sujeto de un agente inhibidor de c-Maf.

En otro aspecto, el presente documento se refiere a un método para prevenir o reducir el riesgo de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de mama HER2+, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto un agente que previene o reduce la metástasis ósea, en el que se administra dicho agente según un régimen de tratamiento determinado a partir de la cuantificación del nivel de expresión de c-Maf en dicho sujeto.

A modo de ilustración no limitativa, los agentes inhibidores de c-Maf adecuados para su uso en el presente documento incluyen oligonucleótidos antisentido, ARN de interferencia (ARNi), ARN catalíticos, ribozimas específicas, anticuerpos inhibidores o nanocuerpos, una variante dominante negativa de c-Maf o compuesto de la tabla 1 ó 2.

#### Oligonucleótidos antisentido

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

Un constructo antisentido del presente documento puede distribuirse, por ejemplo, tal como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en una célula, produce ARN complementario a al menos una parte única del ARNm celular que codifica para c-Maf. Alternativamente, el constructo antisentido es una sonda de oligonucleótido generada *ex vivo* que, cuando se introduce en la célula, produce inhibición de la expresión génica al hibridarse con el ARNm y/o las secuencias génicas de un ácido nucleico diana. Dichas sondas de oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados que son resistentes a nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas y, por tanto, son estables. *in vivo*. Ejemplos de moléculas de ácidos nucleicos para su uso como oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN de fosforamidato, fosfotionato y metilfosfonato

(véanse también las patentes estadounidenses n.os 5.176.996; 5.264.564; y 5.256.775). Además, las aproximaciones generales para la construcción de oligómeros útiles en la terapia antisentido se han revisado, por ejemplo, en Van der Krol *et al.*, *BioTechniques* 6: 958-976, 1988; y Stein *et al.*, *Cancer Res* 48: 2659-2668, 1988.

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

10 Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del ARNm, por ejemplo, la secuencia en 5' no traducida hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG deben funcionar de la manera más eficiente para inhibir la traducción. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que las secuencias complementarias a las secuencias en 3' no traducidas del ARNm también son eficientes para inhibir la traducción del ARNm (Wagner, *Nature* 372: 333, 1994). Por tanto, pueden usarse oligonucleótidos complementarios en las regiones en 5' o 3' no traducidas, regiones no  
15 oligonucleótidos complementarios a la región en 5' no traducida del ARNm deben incluir el complemento del codón de iniciación AUG. Los oligonucleótidos complementarios a la región codificante del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficientes, pero también pueden usarse según el presente documento. Si están diseñados para hibridar con la región en 5', la región en 3' o la región codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deben tener al menos seis nucleótidos de longitud y, preferiblemente, tener menos de aproximadamente 100 y más  
20 preferiblemente menos de aproximadamente 50, 25, 17 ó 10 nucleótidos de longitud.

Preferiblemente, se realizan estudios *in vitro* en primer lugar para cuantificar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido para inhibir la expresión génica. Preferiblemente, estos estudios usan controles que distinguen entre la inhibición del gen antisentido y los efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También preferiblemente, estos estudios compararon los niveles de ARN o proteína diana con los de un control interno de  
25 ARN o proteína. Los resultados obtenidos usando los oligonucleótidos antisentido se pueden comparar con los obtenidos usando un oligonucleótido de control. Preferiblemente, el oligonucleótido de control tiene aproximadamente la misma longitud que el oligonucleótido que va a someterse a ensayo y la secuencia de oligonucleótido no difiere de la secuencia antisentido más de lo que se considera necesario para impedir la hibridación específica con la secuencia diana.

30 El oligonucleótido antisentido puede ser un ADN o ARN mono o bicatenario o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos. El oligonucleótido puede modificarse en el de grupo base, el grupo de azúcar o la estructura principal de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tal como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a los receptores de las células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular  
35 (véanse, por ejemplo, Letsinger *et al.*, *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A.* 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre *et al.*, *Proc. Natl Acad Sci.* 84: 648-652, 1987; la publicación PCT n.º WO 88/09810) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 89/10134), agentes de intercalación (véase, por ejemplo, Zon, *Pharm. Res.* 5: 539-549, 1988). Para este propósito, el oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de transporte, un agente de escisión activado por hibridación, etc.

40 Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos un grupo de base modificada. El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un grupo de azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye pero no se limita a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa. El oligonucleótido antisentido también puede contener una estructura principal similar a un péptido neutro. Dichas moléculas se conocen como oligómeros de ácido nucleico peptídico (ANP) y se describen, por ejemplo, en Perry-O'Keefe *et al.*, *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A.* 93: 14670, 1996, y en Eglom *et al.*, *Nature* 365: 566, 1993.  
45

En aún otra divulgación, el oligonucleótido antisentido comprende al menos una estructura principal de fosfato modificado. En aún otra divulgación, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido alfa-anomérico.

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

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

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

ARNip

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

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

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

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

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

Alternativamente, es posible el uso de vectores en los que cada una de las cadenas que forman el ARNip se forma a partir de la transcripción de una unidad transcripcional diferente. Estos vectores se dividen a su vez en vectores de transcripción divergentes y convergentes. En vectores de transcripción divergentes, las unidades de transcripción que codifican para cada una de las cadenas de ADN que forman el ARNip están ubicadas en tándem en un vector, de modo que la transcripción de cada cadena de ADN depende de su propio promotor, que puede ser el mismo o diferente (Wang, J. *et al.*, 2003, Proc. Natl Acad Sci. USA., 100: 5103-5106 y Lee, N.S, *et al.*, 2002, Nat. Biotechnol, 20: 500-505). En vectores de transcripción convergentes, las regiones de ADN que dan lugar al ARNip forman las cadenas sentido y antisentido de una región de ADN que están flanqueadas por dos promotores inversos. Después de la transcripción de las cadenas de ARN sentido y antisentido, estas últimas formarán el híbrido para formar un ARNip funcional. Se han descrito vectores con sistemas de promotor inverso en los que se han usado 2 promotores U6 (Tran, N. *et al.*, 2003, BMC Biotechnol, 3:21), un promotor U6 de ratón y un promotor H1 humano (Zheng, L, *et al.*, 2004, Proc. Natl Acad Sci. USA., 135-140 y el documento WO 2005026322) y un promotor U6 humano y un promotor H1 de ratón (Kaykas, A. y Moon, R, 2004, BMC Cell Biol, 5:16).

Los promotores adecuados para su uso en la expresión de ARNip a partir de vectores de expresión convergentes o divergentes incluyen cualquier promotor o par de promotores compatibles con las células en las que se va a expresar el ARNip. Por tanto, los promotores adecuados incluyen pero no están limitados necesariamente a promotores constitutivos tales como los derivados de los genomas de virus eucariotas tales como el virus del poliovirus, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de la metalotioneína, el promotor del gen de timidina cinasa del virus del herpes simple, regiones LTR de retrovirus, el promotor del gen de inmunoglobulina, el promotor del gen de actina, el promotor del gen EF-1alfa así como promotores inducibles en los cuales la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o una señal exógena tal como el sistema de tetraciclina, el sistema de NFkappaB/luz UV, el sistema Cre/Lox y el promotor del gen de choque térmico, los promotores de ARN polimerasa II regulables descritos en el documento WO/2006/135436 así como promotores de tejidos específicos (por ejemplo, el promotor de PSA descrito en el documento WO2006012221). En una realización preferida, los promotores son promotores de ARN polimerasa III que actúan de manera constitutiva. Los promotores de ARN polimerasa III se encuentran en un número limitado de genes como el ARN 5S, el ARNt, el ARN 7SL y el ARNp U6. A diferencia de otros promotores de ARN polimerasa III, los promotores de tipo III no requieren ninguna secuencia intragénica, sino que necesitan secuencias en el

sentido de 5' que comprenden una caja TATA en las posiciones -34 y -24, un elemento de secuencia proximal o PSE entre -66 y -47 y en algunos casos, un elemento de secuencia distal o DSE entre las posiciones -265 y -149. En una realización preferida, los promotores de ARN polimerasa III de tipo III son los promotores de los genes H1 y U6 humanos o murinos. En una realización aún más preferida, los promotores son 2 promotores U6 humanos o murinos, un promotor U6 de ratón y un promotor H1 humano o un promotor U6 humano y un promotor H1 de ratón. En el contexto del presente documento, los promotores del gen ER alfa o los promotores del gen de ciclina D1 son especialmente adecuados y, por tanto, se prefieren especialmente para expresar específicamente los genes de interés en tumores de mama, preferiblemente en tumores de mama HER2+.

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

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

El ARNip y ARNhc del presente documento se pueden obtener usando una serie de técnicas conocidas por los expertos en la técnica. La región de la secuencia de nucleótidos tomada como base para diseñar el ARNip no es limitativa y puede contener una región de la secuencia codificante (entre el codón de iniciación y el codón de terminación) o puede contener alternativamente secuencias de la región en 3' o 5' no traducida, preferiblemente de entre 25 y 50 nucleótidos de longitud y en cualquier posición en la posición en el sentido de 3' con respecto al codón de iniciación. Un modo de diseñar un ARNip implica la identificación de los motivos AA(N19)TT en los que N puede ser cualquier nucleótido en la secuencia del gen MAF, y la selección de aquellos que tienen un alto contenido de G/C. Si no se encuentra dicho motivo, es posible identificar el motivo NA(N21) en el que N puede ser cualquier nucleótido.

Los ARNip específicos de MAF incluyen el ARNip descrito en el documento WO2005046731, una de cuyas cadenas es ACGGCUCGAGCAGCGACAA (SEQ ID NO: 6). Otras secuencias de ARNip específico de MAF incluyen, pero no se limitan a, CUUACCAGUGUGUUCACAA (SEQ ID NO: 7), UGGAAGACUACUACUGGAUG (SEQ ID NO: 8), AUUUGCAGUCAUGGAGAACC (SEQ ID NO: 9), CAAGGAGAAAUACGAGAAGU (SEQ ID NO: 10), ACAAGGAGAAAUACGAGAAG (SEQ ID NO: 11) y ACCUGGAAGACUACUACUGG (SEQ ID NO: 12).

#### Enzimas de ADN

Por otro lado, el presente documento también contempla el uso de enzimas de ADN para inhibir la expresión del gen MAF del presente documento. Las enzimas de ADN incorporan algunas de las características mecánicas de las tecnologías tanto antisentido como de ribozima. Las enzimas de ADN están diseñadas de tal manera que reconocen una secuencia de ácido nucleico diana particular similar al oligonucleótido antisentido, sin embargo, como la ribozima, son catalíticas y escinden específicamente el ácido nucleico diana.

#### Ribozimas

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

Las ribozimas usadas en el presente documento incluyen ribozimas de cabeza de martillo, ARN endorribonucleasas (a continuación en el presente documento "ribozimas de tipo Cech") (Zaug *et al.*, Science 224: 574-578, 1984).

Las ribozimas pueden formarse por oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para mejorar la estabilidad, la selección como diana, etc.) y deben distribuirse a las células que expresan el gen diana *in vivo*. Un método de distribución preferido implica el uso de un constructo de ADN que "codifica para" la ribozima bajo el control de un promotor fuerte constitutivo pol III o pol II, de modo que las células transfectadas produzcan cantidades suficientes

de la ribozima para destruir los mensajeros diana endógenos e inhibir la traducción. Dado que las ribozimas son catalíticas, a diferencia de otras moléculas antisentido, se requiere una concentración intracelular baja para su eficiencia.

#### Anticuerpos inhibidores

5 En el contexto del presente documento, "anticuerpo inhibidor" se entiende como cualquier anticuerpo que puede unirse específicamente a la proteína c-Maf e inhibir una o más de las funciones de dicha proteína, preferiblemente aquellas relacionadas con la transcripción. Los anticuerpos pueden prepararse usando cualquiera de los métodos que conoce el experto en la técnica, algunos de los cuales se han mencionado anteriormente. Por tanto, los anticuerpos policlonales se preparan mediante la inmunización de un animal con la proteína que va a inhibirse. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Kohler, Milstein *et al.* (Nature, 1975, 256: 495). En el contexto del presente documento, los anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos intactos que comprenden una región de unión a antígeno variable y una región constante, fragmentos "Fab", "F(ab')<sub>2</sub>" y "Fab'", Fv, scFv, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos, alfacuerpos, ciclopéptidos y péptidos de tipo grapa. Una vez que se identifican anticuerpos con capacidad de unión a la proteína c-Maf, se seleccionarán aquellos que pueden inhibir la actividad de esta proteína usando un ensayo de identificación de agente inhibidor.

#### Péptidos inhibidores

Tal como se usa en el presente documento, el término "péptido inhibidor" se refiere a aquellos péptidos que pueden unirse a la proteína c-M e inhibir su actividad tal como se ha explicado anteriormente, es decir, impidiendo que el c-Maf pueda activar la transcripción génica.

#### 20 Dominantes negativos de c-maf

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

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

35 El presente documento contempla el uso tanto de variantes dominantes negativas de c-Maf como de polinucleótidos que codifican para MAF bajo el control operativo de un promotor adecuado para la expresión en células diana. Los promotores que pueden usarse para regular la transcripción de polinucleótidos del presente documento pueden ser promotores constitutivos, es decir, promotores que dirigen la transcripción a nivel basal, o promotores inducibles en los que la actividad transcripcional requiere una señal externa. Los promotores constitutivos adecuados para regular la transcripción son, entre otros, el promotor de CMV, el promotor de SV40, el promotor DHFR, el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor del factor de alargamiento 1a (EF1a), el promotor de albúmina, el promotor ApoA1, el promotor de queratina, el promotor CD3, el promotor de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, el promotor de neurofilamento, el promotor enolasa específica de neuronas, el promotor L7, el promotor CD2, el promotor de cinasa de cadena ligera de miosina, el promotor del gen HOX, el promotor de timidina cinasa, el promotor de ARN polimerasa II, el promotor del gen MyoD, el promotor del gen de fosfogliceratocinasa (PGK), el promotor de lipoproteína de baja densidad (LDL), el promotor del gen de actina. En una divulgación preferida, el promotor que regula la expresión del transactivador es el promotor del gen PGK. En una divulgación preferida, el promotor que regula la transcripción de polinucleótidos del presente documento es el promotor de ARN polimerasa del fago T7.

50 Preferiblemente, los promotores inducibles que pueden usarse en el contexto del presente documento son aquellos que responden a un agente inductor que muestra una expresión basal nula o despreciable en ausencia de un agente inductor y que pueden promover la activación del gen ubicado en la posición 3'. Dependiendo del tipo de agente inductor, los promotores inducibles se clasifican como promotores de activación/desactivación de Tet (Gossen, M. y H. Bujard (1992) Proc. Natl Acad Sci. USA, 89: 5547-5551; Gossen, M. *et al.*, 1995, Science 268: 1766-1769; Rossi, F.M.V. y H.M. Blau, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 451-456); promotores de activación/desactivación de Pip (documento US 6287813); promotores dependientes de antiprogesterina (documento US 2004132086), promotores dependientes de ecdisona (Christopherson *et al.*, 1992, Proc. Natl Acad Sci. USA, 89: 6314-6318; No *et al.*, 1996, Proc. Natl Acad Sci. USA, 93: 3346-3351, Suhr *et al.*, 1998, Proc. Natl Acad Sci. USA, 95: 7999-8004 y documento

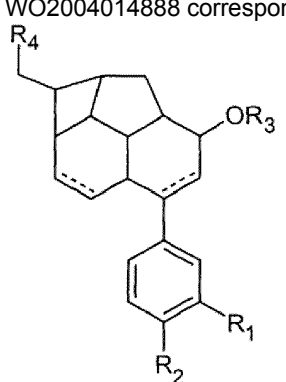
WO9738117), un promotor dependiente de metalotioneína (documento WO8604920) y los promotores dependientes de rapamicina (Rivera *et al.*, 1996, Nat. Med. 2:1028-32).

5 Los vectores adecuados para expresar el polinucleótido que codifica para la variante dominante negativa de c-Maf incluyen vectores derivados de vectores de expresión procariotas, tales como pUC18, pUC19, Bluescript y derivados de los mismos, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, fagos y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28, vectores de expresión de levaduras tales como vectores de plásmidos del tipo de 2 micrómetros, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión de células de insectos tales como vectores de la serie pAC y vectores de la serie pVL, vectores de expresión de plantas tales como pIB1, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, vectores de la serie pORE y similares y vectores de expresión de células eucariotas superiores basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados con adenovirus, retrovirus y particularmente lentivirus), vectores no virales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEFI/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCl, pSVL y pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1.

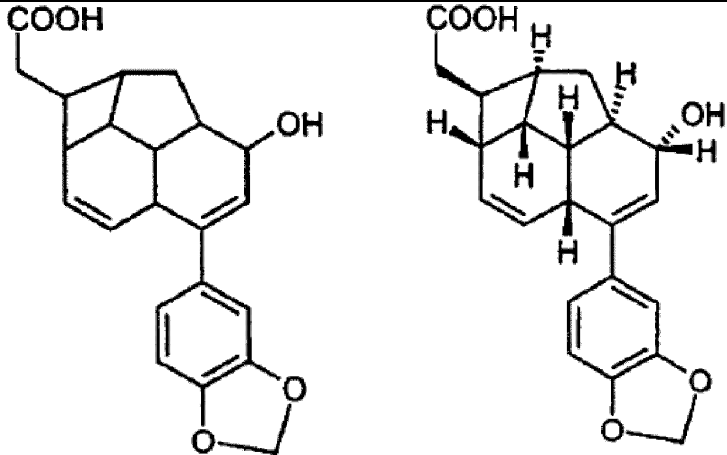
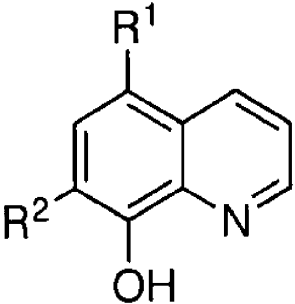
Moléculas pequeñas

15 Otros compuestos inhibidores de c-Maf adecuados incluyen:

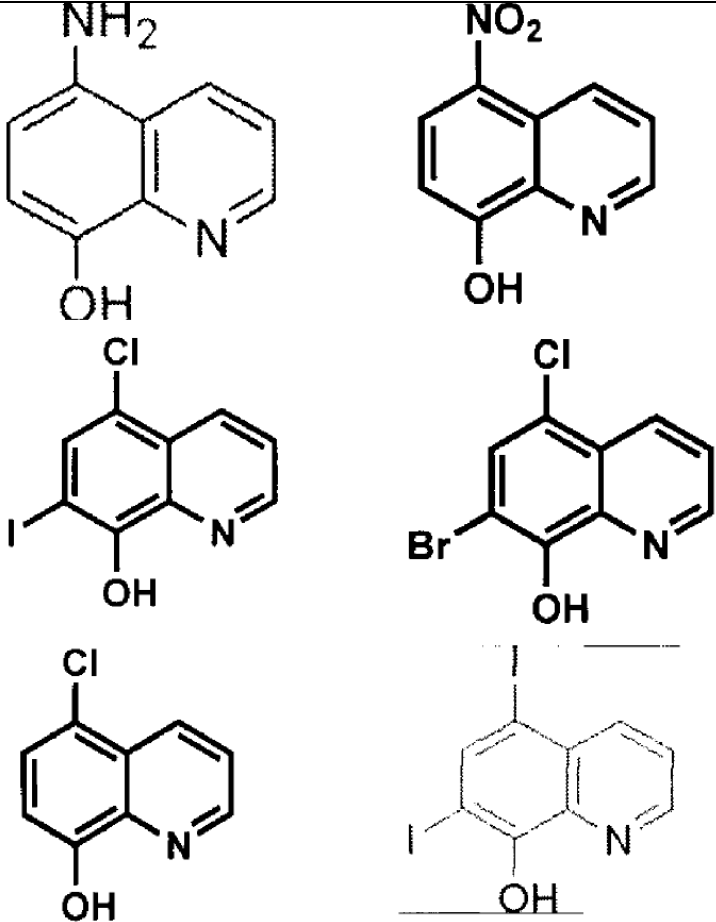
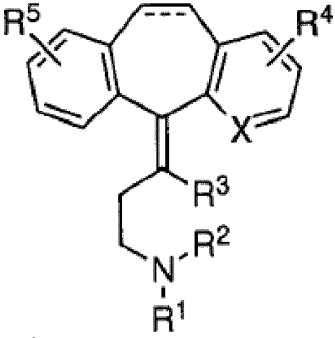
Tabla 1: moléculas pequeñas con capacidad inhibidora de c-Maf

I	<p>Derivados de H del ácido endiátrico tales como los descritos en el documento WO2004014888 correspondientes a la fórmula general</p>  <p>en la que  R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son, independientemente entre sí,  1.0 H o  2.0 un -O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -O-alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, -O-alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> u -O-arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, en los que el alquilo, alquenilo y alquinilo son de cadena lineal o ramificada, y en los que los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo están mono o disustituidos con:  2.1 -OH,  2.2 =O,  2.3 -O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada,  2.4 -O-alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada,  2.5 arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>,  2.6 -NH-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada,  2.7 -NH-alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, en el que alquenilo es de cadena lineal o ramificada,  2.8 -NH<sub>2</sub> o  2.9 halógeno</p>
---	---

	<p>y en la que el grupo arilo está opcionalmente mono o disustituido con el sustituyente 2.1 ó 2.3 a 2.9,  en la que los sustituyentes 2.3, 2.4, 2.6 y 2.7 pueden estar sustituidos además con las funciones -CN, -amida u -oxima, y 2.5 puede estar sustituido además con las funciones -CN o amida, o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> forman juntos un anillo, en el que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> significan un grupo -O-[alquenilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)]-O-,  R<sub>3</sub> es  1.0 H o  2.0 un grupo -O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -O-alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, -O-alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> u -O-arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, en los que el alquilo, alquenilo y alquinilo son de cadena lineal o ramificada, y en los que los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo están mono o disustituidos con:  2.1 -OH,  2.2 =O,  2.3 -O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada,  2.4 -O-alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada,  2.5 -O-arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>,  2.6 -NH-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada,  2.7 -NH-alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada,  2.8 -NH<sub>2</sub> o  2.9 halógeno  y en la que el grupo arilo está opcionalmente mono o disustituido con el sustituyente 2.1 ó 2.3 a 2.9,  en la que los sustituyentes 2.3, 2.4, 2.6 y 2.7 pueden estar sustituidos además con las funciones -CN, -amida u -oxima, y 2.5 puede estar sustituido además con las funciones -CN o amida  R<sub>4</sub> es CO<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>NHR<sub>3</sub>, CHO, CH<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OSi(R<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Br, CH<sub>2</sub>CN, en la que  R<sub>3</sub> es tal como se definió anteriormente,  y, en particular, los compuestos.</p>
--	--

	
<p>ii</p>	<p>8-derivados de hidroxiquinolina como los descritos en el documento WO2009146546 de formula general</p>  <p>en la que  R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y N(alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);  R<sub>2</sub> se selecciona de H, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> fluorosustituido o  R<sub>1</sub> es Cl y R<sub>2</sub> es Br o H,  y, preferentemente, los compuestos</p>



	
<p>III</p>	<p>Clioquinol (5-cloro-7-yodoquinolin-8-ol) tal como se describe en el documento WO09049410</p>
<p>IV</p>	<p>Compuestos tales como los descritos en el documento WO08098351 de formula general</p>  <p>en la que          == - : - : es un enlace sencillo o doble,          R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, C(O)O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, C(O)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y C(O)NH-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;</p>

	<p>R<sup>2</sup> se selecciona de H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;  R<sup>3</sup> se selecciona de H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;  o R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se unen entre sí junto con los átomos de carbono y nitrógeno a los que están unidos para formar un anillo de piperidina,  R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente de H, halógeno, hidroxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> fluorosustituido y alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; y  X se selecciona de C y N,  y compuestos preferidos tales como  Ciproheptadina (clorhidrato de 4-(5H-dibenzo-[a,d]-ciclohepten-5-iliden)-1-metilpiperidina),  Amitriptilina (3-(10,11-dihidro-5H-dibenzo[[a,d]]ciclohepten-5-ilideno)-N,N-dimetil-1-propanamina),  Loratadina (4-(8-cloro-5,6-dihidro-11H-benzo[5,6]-ciclohepta[1,2-b]-piridin-11-iliden)-1-piperidincarboxilato de etilo,  Ciclobenzaprina (3-(5H-dibenzo[a,d]-ciclohepten-5-iliden)-N,N-dimetil-1-propanamina).</p>
v	Nivalenol (12,13-epoxi-3,4,7,15-tetrahidroxitricotec-9-en-8-ona) tal como se describe en el documento WO0359249

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

Tabla 2: inhibidores de c-Maf

Antagonista	Referencia para la actividad inhibidora de cdk2
<p><b>Análogos de purina</b>  Los purvalanoles tales como 2-(1R-isopropil-2-hidroxiethylamino)-6-(3-cloroamino)-9-isopropilpurina que tienen una fórmula molecular de C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>O disponibles de Sigma-Aldrich con el nombre comercial purvalanol A (n.º P4484, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), Purvalanol B, aminopurvalanol, compuesto 52 (en el que el isopropilo del purvalanol A se reemplaza por H)</p>	<p>Gray N.S. <i>et al.</i>, Science, 281, 533-538 (1998);  Chang Y.T. <i>et al.</i>, Chem. Biol., 6, 361-375 (1999).</p>
<p>2-(Hidroxiethylamino)-6-bencilamino-9-metil-purina que tiene una fórmula molecular de C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial olomoucina (n.º O0886),  2-(2'-Hidroxiethylamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina que tiene una fórmula molecular de C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial N<sup>9</sup>-isopropilolomoucina (n.º I0763);  CVT-313</p>	<p>Vesely, J., <i>et al.</i>, (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86, 11;  Brooks, E.E. <i>et al.</i>, (1997) J. Biol. Chem., 272, 29207-11</p>
<p>6-(Bencilamino)-2-(R)-[[1-(hidroximetil)propil]amino]-9-isopropilpurina 2-(R)-[[9-(1-metiletil)-6-(fenilmetil)amino]-9H-purin-2-il]amino]-1-butanol que tiene una fórmula molecular de C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial roscovitina (n.º R7772),  metoxi-roscovitina</p>	<p>Wand, D. <i>et al.</i>, J. Virol., 75, 7266-7279 (2001); McClue, S.J. <i>et al.</i>, Int. J. Cancer, 102, 463-468 (2002);  Meijer, L. <i>et al.</i>, (1997) Eur. J. Biochem., 243, 527-36</p>
<p>Análogo de purina N2-(cis-2-aminociclohexil)-N6-(3-clorofenil)-9-etil-9H-purina-2,6-diamina que tiene una fórmula molecular de C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>7</sub> disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial CGP74514 (n.º C3353)</p>	<p>Imbach, P. <i>et al.</i>, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999);  Dreyer, M.K. <i>et al.</i>, J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).</p>
<p>CPG79807, un análogo de purina de CGP74514 (citado anteriormente) en el que se reemplaza Cl por CN, se elimina OH y la posición en orto del anillo de ciclohexano es NH<sub>2</sub></p>	<p>Imbach, P. <i>et al.</i>, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999);  Dreyer, M.K. <i>et al.</i>, J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).</p>
<p>Análogo de purina tal como O6-ciclohexilmetil-guanina NU2058</p>	<p>Arris, C.E. <i>et al.</i>, J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000);  Davies <i>et al.</i>, Nature Structural Biology, 9:10, 745-749, 2002</p>

Análogo de purina tal como NU6102	Arris, C.E. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000); Davies <i>et al.</i> , Nat. Struc. Biol., 9, 745-749, 2002
Isopentenil-adenina	Vesely, J., <i>et al.</i> , (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86
<b>Agentes no basados en purina</b>	
Indirubinas tales como la 3'-monooxima de indirubina que tiene una fórmula molecular de C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial (n.º I0404) 5-sulfonato de indirubina, 5-cloro-indirubina	Davies, T.G. <i>et al.</i> , Structure, 9, 389-397 (2001); Marko, D. <i>et al.</i> , Br. J. Cancer, 84, 283-289 (2001); Hoessel, R. <i>et al.</i> , (1999) Nat. Cell Biol., 1, 60-7; documento PCT/US02/30059 concedido a Hellberg <i>et al.</i> , publicado como documento WO 03/027275.
Oxoindol 1 de Fischer tal como se hace referencia en la columna 2 de esta tabla (n.º IN118, JMAR Chemical)	Porcs-Makkay, M. <i>et al.</i> , Tetrahedron 2000, 56, 5893, Org. Process Res. Dev., 2000, 4, 10
Indenopirazoles	Nugiel, D.A. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 44, 1334-1336 (2001); Nugiel, D.A. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 45, 5224-5232 (2002); Yue, E.W. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 45, 5233-5248 (2002).
Pirido(2,3-d)pirimidin-7-onas, compuesto 3 de Fischer	Barvian, M. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 43, 4606-4616 (2000); Toogood, P.L., Med. Res. Rev., 21, 487-498 (2001).
Quinazolininas tales como anilinoquinazolina	Sielecki, T.M. <i>et al.</i> , Bioorg. Med. Chem. Lett., 11, 1157-1160 (2001); Mettey <i>et al.</i> , J. Med. Chem. 2003, 46, 222-236.
Tiazoles tales como el tiazol condensado, 4-[[[(7-oxo-6,7-dihidro-8H-[1,3]tiazolo[5,4-e]indol-8-iliden)metil]amino}-N-(2-piridil)benzenosulfonamida que tiene una fórmula molecular de C <sub>21</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial GW8510 (n.º G7791)	Davis S.T. <i>et al.</i> , Science, 291, 134-137 (2001); documento PCT/US02/30059 concedido a Hellberg <i>et al.</i> , publicado como documento WO 03/027275.
Flavopiridoles tales como flavopiridol (L86 8275; NCS 649890, Instituto Nacional del Cáncer, Bethesda, MD) y un descloroderivado	Carlson, B.A. <i>et al.</i> , (1996) Cancer Res., 56, 2973-8
Alcaloides tales como estaurosporina (n.º S1016, A.G. Scientific, San Diego, CA) o UCN-01 (7-hidroxiestaurosporina) Instituto Nacional del Cáncer, Bethesda, MD	Rialet V. <i>et al.</i> , (1991) Anticancer Res., 11, 1581-90; Wang, Q., <i>et al.</i> , (1995) Cell Growth Differ., 6, 927-36, Akiyama T. <i>et al.</i> , (1997) Cancer Res., 57, 1495-501, Kawakami, K. <i>et al.</i> , (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., 219, 778-83.
Paulonas tales como 9-bromo-7,12-dihidro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-ona que tiene una fórmula molecular de C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> BrN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial kenpaulona (n.º K3888) o 9-nitro-7,12-dihidroindolo-[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-ona que tiene una fórmula molecular de C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial alsterpaulona (n.º A4847)	Zaharevitz, D.W. <i>et al.</i> , Cancer Res., 59, 2566-2569 (1999); Schultz, C. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 42, 2909-2919 (1999); Zaharevitz, D.W. <i>et al.</i> , (1999) Cancer Res., 59, 2566-9; documento PCT/US02/30059 concedido a Hellberg <i>et al.</i> , publicado como documento WO 03/027275.
CGP 41251, un alcaloide	Begemann, M. <i>et al.</i> , (1998) Anticancer Res., 18, 2275-82; Fabbro <i>et al.</i> , Pharmacol. Ther. mayo-junio de 1999; 82(2-3):293-301
Himendialdisinas tales como 10z-himendialdisina que tiene una fórmula molecular de C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> BrN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> disponible de Biochemicals.net, una división de A.G. Scientific, Inc. (San Diego, CA) (H-1150)	Meijer, L. <i>et al.</i> , (1999) Chemistry & Biology, 7, 51-63; documento PCT/US02/30059 concedido a Hellberg <i>et al.</i> , publicado como documento WO 03/027275.
CGP60474, una fenilaminopirimidina	21; documento WO 95/09853, Zimmermann

	<i>et al.</i> , 21 de septiembre de 1994
Tiazolopirimidina 2	Attaby <i>et al.</i> , <i>Z. Naturforsch.</i> , 54b, 788-798 (1999)
Diarilurea	Honma T. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 44, 4628-4640 (2001), Honma T. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 44, 4615-4627 (2001).
Éster metílico del ácido (2R)-2,5-dihidro-4-hidroxi-2-[(4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)fenil)metil]-3-(4-hidroxifenil)-5-oxo-2-furanocarboxílico que tiene una fórmula molecular de C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub> disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial butirolactona-I (B7930)	Kitagawa, M. <i>et al.</i> , <i>Oncogene</i> , 8, 2425-2432 (1993).
Aloisina A, n.º de cat. 128125 (Calbiochem, San Diego, CA)	Metthey <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> 2003, 46, 222-236.

En una divulgación preferida, la metástasis ósea es metástasis osteolítica.

Los agentes inhibidores de c-Maf se administran normalmente en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

El término "portador" se refiere a un diluyente o un excipiente mediante el cual se administra el principio activo.

- 5 Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceite, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Las disoluciones salinas acuosas o en agua y las disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para disoluciones inyectables, se usan preferiblemente como portadores. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin, 1995.
- 10 Preferiblemente, los portadores del presente documento están aprobados por la agencia reguladora del gobierno estatal o federal o están enumerados en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales y más particularmente en seres humanos.

15 Los portadores y sustancias auxiliares necesarios para fabricar la forma de dosificación farmacéutica deseada de la composición farmacéutica del presente documento dependerán, entre otros factores, de la forma de dosificación farmacéutica elegida. Dichas formas de dosificación farmacéutica de la composición farmacéutica se fabricarán según los métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica. Una revisión de los diferentes métodos para administrar los principios activos, los excipientes que deben usarse y los procedimientos para producirlos se puede encontrar en "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. edición de 1993. Los ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (comprimidos, pastillas, cápsulas, gránulos, etc.) o composición líquida (disoluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral.

20 Además, la composición farmacéutica puede contener, según se considere necesario, estabilizantes, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares.

25 Para su uso en medicina, los agentes inhibidores de c-Maf pueden encontrarse en forma de un profármaco, una sal, un solvato o clatrato, ya sea aislados o en combinación con agentes activos adicionales y pueden formularse junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes preferidos para el uso de los mismos incluyen azúcares, almidones, celulosas, cauchos y proteínas. En una realización particular, la composición farmacéutica del presente documento se formulará en una forma de dosificación farmacéutica sólida (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, pastillas, gránulos, supositorios, sólidos amorfos o cristalinos estériles que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas, etc.), forma de dosificación farmacéutica líquida (por ejemplo, disoluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, pomadas, etc.) o forma de dosificación farmacéutica semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por cualquier vía, incluida, entre otras, la vía oral, la vía intravenosa, la vía intramuscular, la vía intraarterial, la vía intramedular, la vía intratecal, la vía intraventricular, la vía transdérmica, la vía subcutánea, la vía intraperitoneal, la vía intranasal, la vía enteral, la vía tópica, la vía sublingual o la vía rectal. Una revisión de los diferentes modos de administración de los principios activos, de los excipientes que deben usarse y de los procedimientos de fabricación de los mismos se puede encontrar en Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. edición de 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, EE. UU. (2000). Se conocen en el estado de la técnica ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables e incluyen disoluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos portadores pueden formularse mediante procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

35

40

45 En el caso de que se administren ácidos nucleicos (ARNip, polinucleótidos que codifican para ARNip o ARNhc o polinucleótidos que codifican para dominantes negativos de MAF), el presente documento contempla composiciones farmacéuticas preparadas particularmente para administrar dichos ácidos nucleicos. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender dichos ácidos nucleicos desnudos, es decir, en ausencia de compuestos que protejan los ácidos nucleicos frente a la degradación por las nucleasas del organismo, lo que conlleva la ventaja de que se elimina la toxicidad asociada con los reactivos usados para la transfección. Las vías de administración

adecuadas para los compuestos desnudos incluyen la vía intravascular, la vía intratumoral, la vía intracraneal, la vía intraperitoneal, la vía intraesplénica, la vía intramuscular, la vía subretiniana, la vía subcutánea, la vía mucosa, la vía tópica y la vía oral (Templeton, 2002, *DNA Cell Biol.*, 21: 857-867). Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden administrarse formando parte de liposomas conjugados con colesterol o conjugados con compuestos que pueden promover la translocación a través de membranas celulares tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT del VIH-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simple, los oligómeros de arginina y los péptidos descritos en el documento WO07069090 (Lindgren, A. *et al.*, 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21: 99-103, Schwarze, S.R. *et al.*, 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21: 45-48, Lundberg, M *et al.*, 2003, *Mol Therapy* 8: 143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, *Pharm. Res.* 21: 389-393). Alternativamente, el polinucleótido puede administrarse formando parte de un vector plasmídico o vector viral, preferiblemente vectores basados en adenovirus, en virus adenoasociados o en retrovirus tales como virus basados en el virus de la leucemia murina (MLV) o en lentivirus (VIH, FIV, EIAV).

Los agentes inhibidores de c-Maf o las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden administrarse a una dosis de menos de 10 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente menos de aproximadamente 2, aproximadamente 1, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,05, aproximadamente 0,01, aproximadamente 0,005, aproximadamente 0,001, aproximadamente 0,0005, aproximadamente 0,0001, aproximadamente 0,00005 o aproximadamente 0,00001 mg por kg de peso corporal. La dosis unitaria puede administrarse mediante inyección, inhalación o administración tópica.

La dosis depende de la gravedad y la respuesta del estado que se va a tratar y puede variar entre varios días y meses o hasta que desaparezca el estado. La dosis óptima puede determinarse midiendo periódicamente las concentraciones del agente en el cuerpo del paciente. La dosis óptima puede determinarse a partir de los valores de CE50 obtenidos por medio de ensayos *in vitro* o *in vivo* en modelos animales. La dosis unitaria puede administrarse una vez al día o menos de una vez al día, preferiblemente menos de una vez aproximadamente cada 2, aproximadamente cada 4, aproximadamente cada 8 o aproximadamente cada 30 días. Alternativamente, es posible administrar una dosis inicial seguida de una o varias dosis de mantenimiento, generalmente de una cantidad menor que la dosis inicial. El régimen de mantenimiento puede implicar tratar al paciente con una dosis que oscila entre aproximadamente 0,01 µg y aproximadamente 1,4 mg/kg de peso corporal al día, por ejemplo aproximadamente 10, aproximadamente 1, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,01, aproximadamente 0,001 o aproximadamente 0,00001 mg por kg de peso corporal al día. Las dosis de mantenimiento se administran preferiblemente como máximo una vez cada 5, aproximadamente cada 10 o aproximadamente cada 30 días. El tratamiento debe continuarse durante un tiempo que variará según el tipo de trastorno que experimente el paciente, la gravedad del mismo y el estado del paciente. Después del tratamiento, se debe controlar el progreso del paciente para determinar si la dosis debe aumentarse en caso de que la enfermedad no responda al tratamiento o se reduce la dosis si se observa una mejora de la enfermedad o si se observan efectos secundarios no deseados.

#### Tratamiento o prevención de la degradación ósea en pacientes con cáncer de mama con una metástasis ósea que tienen niveles elevados de MAF

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un agente que puede evitar o prevenir la degradación ósea para su uso en la prevención, inhibición o el tratamiento de una metástasis ósea de cáncer de mama HER2+ o evitar o prevenir la degradación ósea en cáncer de mama HER2+ en un sujeto que padece cáncer de mama HER2+ que se ha identificado como que tiene una amplificación del gen MAF o un número de copias aumentado en comparación con una muestra de control, en el que el agente que puede evitar o prevenir la degradación ósea se selecciona del grupo que consiste en un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, un inhibidor de PTH o uno de PTHLH, incluidos los anticuerpos bloqueantes, o formas recombinantes de los mismos, un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor dual de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógenos, calcitonina, un inhibidor de la catepsina K y Alfaradin.

En otro aspecto, el presente documento se refiere al uso de un agente inhibidor de c-Maf o un agente que puede evitar o prevenir la degradación ósea para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de mama HER2+ y que tiene niveles elevados de MAF en una muestra metastásica con respecto a una muestra de control.

Alternativamente, el presente documento se refiere a un método de prevención y/o tratamiento de la degradación en un sujeto que padece cáncer de mama HER2+ y que tiene niveles elevados de MAF en una muestra metastásica con respecto a una muestra de control, que comprende administrar un agente inhibidor de c-Maf o un agente para evitar o prevenir la degradación ósea a dicho sujeto.

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

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

La muestra de referencia o de control es una muestra de un sujeto con cáncer de mama HER2+, que no ha experimentado metástasis o que corresponde a la mediana de valores del nivel de expresión del gen MAF medido

en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de mama HER2+ que no han experimentado metástasis.

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

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

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

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención y no limitan su alcance.

Kits del presente documento.

15 En otro aspecto, el presente documento se refiere a un kit para predecir una metástasis ósea de un cáncer de mama HER2+, en un sujeto que padece dicho cáncer, comprendiendo el kit: a) medios para cuantificar el nivel de expresión de MAF en una muestra de dicho sujeto; y b) medios para comparar el nivel de expresión cuantificado de MAF en dicha muestra con un nivel de expresión de MAF de referencia.

20 En otro aspecto, el presente documento se refiere a un kit para predecir el desenlace clínico de un sujeto que padece metástasis ósea de un cáncer de mama HER2+, comprendiendo el kit: a) medios para cuantificar el nivel de expresión de MAF en una muestra de dicho sujeto; y b) medios para comparar el nivel de expresión cuantificado de MAF en dicha muestra con un nivel de expresión de MAF de referencia.

25 En otro aspecto, el presente documento se refiere a un kit para determinar una terapia para un sujeto que padece cáncer de mama HER2+, comprendiendo el kit: a) medios para cuantificar el nivel de expresión de MAF en una muestra de dicho sujeto; b) medios para comparar el nivel de expresión cuantificado de MAF en dicha muestra con un nivel de expresión de MAF de referencia; y c) medios para determinar una terapia para prevenir y/o reducir la metástasis ósea en dicho sujeto basándose en la comparación del nivel de expresión cuantificado con el nivel de expresión de referencia.

30 En otro aspecto, el presente documento se refiere a un kit que comprende: i) un reactivo para cuantificar el nivel de expresión de MAF en una muestra de un sujeto que padece cáncer de mama HER2+, y ii) uno o más índices de nivel de expresión del gen MAF que se han predeterminado para correlacionarse con el riesgo de metástasis ósea.

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

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

En particular, el cáncer de mama es cáncer de mama HER2+.

Todas las realizaciones y aspectos particulares de los métodos de la presente invención y el documento son aplicables a los kits del presente documento y a sus usos.

Método para tipificar una muestra de un sujeto que padece cáncer de mama

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para tipificar una muestra de un sujeto que padece cáncer de mama HER2+, comprendiendo el método:

a) proporcionar una muestra de cáncer de mama HER2+ de dicho sujeto;

b) cuantificar la amplificación o el número de copias de MAF en dicha muestra;

45 c) tipificar dicha muestra comparando la amplificación cuantificada del número de copias de MAF con un nivel de referencia de MAF predeterminado;

en el que dicha tipificación proporciona información de pronóstico relacionada con el riesgo de metástasis ósea en dicho sujeto.

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

En un aspecto preferido, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

Método para clasificar un sujeto que padece cáncer de mama.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para clasificar a un sujeto que padece cáncer de mama HER2+ en una cohorte, que comprende: a) determinar la amplificación o el número de copias de MAF en una muestra de cáncer de mama HER2+ de dicho sujeto; b) comparar la amplificación o el número de copias de MAF en dicha muestra con un nivel de referencia de MAF predeterminado; y c) clasificar dicho sujeto en una cohorte basándose en dicho nivel de expresión de MAF en la muestra.

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

10 En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

En una realización preferida, dicha cohorte comprende al menos otro individuo al que se ha determinado que tiene un nivel de expresión comparable de MAF en comparación con dicho nivel de expresión de referencia.

15 En otro aspecto preferido, el nivel de expresión de MAF en dicha muestra está aumentado con respecto a dicho nivel de referencia predeterminado, y en el que los miembros de la cohorte se clasifican como que tienen un riesgo aumentado de metástasis ósea.

En otra realización preferida, dicha cohorte es para realizar un ensayo clínico. En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

**Ejemplos**

EJEMPLO 1

20 Procedimientos experimentales y conjuntos de datos.

Cohorte de muestra de tumor primario de cáncer de mama:

25 La cohorte de cáncer de mama usada estaba compuesta por más de 334 muestras de cáncer de mama primario de pacientes con BC en estadio I, II o III y seguimiento con anotaciones clínicas, incluido el sitio de metástasis (*Rojo F, Ann Oncol (2012) 23 (5): 1156-1164*). Se procesaron microalineamientos de tejido según procedimientos convencionales. Se clasificaron tumores de cáncer de mama en diversos subtipos, incluidos ER+, triple negativo y HER2+, y luego se realizaron los análisis estadísticos apropiados para comprobar si la expresión de MAF (MAF) y la amplificación de 16q22-24 en estos tumores se correlacionan con eventos de metástasis ósea en los subtipos de interés.

Los análisis estadísticos en esta cohorte se basaron en las siguientes premisas:

30 A) Incidencia acumulada

Para la figura 1b, se obtuvieron los valores de p después de ajustar los modelos de riesgo proporcional de causa específica de Cox con eventos competitivos (muerte antes de metástasis ósea en cualquier momento) y realizar pruebas de relación de probabilidad.

B) Comparación de las características de nivel inicial (Tabla S1).

35 Se sometieron a prueba las diferencias de edad con la prueba de la t de Student. Se sometieron a prueba todas las demás variables con la prueba exacta de Fisher.

Validación de la capacidad de pronóstico para predecir una metástasis ósea de la amplificación genómica de ADN de 16q22-24 mediante determinación de FISH.

40 Para validar adicionalmente la capacidad de amplificación genómica 16q22-24 para predecir específicamente el riesgo de metástasis ósea, se analizó la ganancia genómica de la región cromosómica 16q22-24 mediante FISH (se usó una sonda de diagnóstico disponible comercialmente que determina la región genómica 16q23, sonda IGH/MAF de Abbot Vysis y se normalizó el número de copias de 16q23 usando una sonda centromérica de cr. 16, 16q11.2 (CEP16)) en un conjunto compuesto por 334 muestras de cáncer de mama primario de pacientes con BC en estadio I, II o III y seguimiento con anotaciones (*Rojo F., Ann Oncol (2012) 23 (5): 1156-1164*). Se procesaron microalineamientos de tejido según procedimientos convencionales. Se incubaron los portaobjetos con MAF (16q23) y se tiñeron independientemente usando la sonda CEP16. Se aplicó contratinción de DAPI y se adquirieron imágenes con un microscopio adecuado. Se estratificaron los pacientes según  $16q23/CEP16 < 1,5$  FISH como grupo negativo y  $16q23/CEP16 > 1,5$  FISH como grupo positivo basándose en el promedio de 50 células por tumor (figura 1a).

50 Se determinó el gráfico de incidencia acumulada (figura 1b) para metástasis ósea en cualquier momento (línea

continua) y muerte antes de la recidiva en hueso (línea discontinua) en el conjunto de tumor primario humano de BC en estadio I, II y III (n=334) y mostró significación estadística.

Determinación del régimen de tratamiento en sujeto diagnosticado con HER2+ basándose en los niveles de expresión de MAF

5 Se obtiene una muestra de tejido tumoral de un sujeto diagnosticado como que tiene cáncer de mama HER2+. Se corta la muestra en secciones delgadas de tejido y se incrusta en parafina. Cada sección de parafina se monta en un portaobjetos. Se incuban los portaobjetos con anticuerpo anti-MAF. Para la visualización y detección de anticuerpos unidos a MAF, se usan anticuerpos conjugados con colorante fluorescente. Se visualizan los portaobjetos proporcionando haces de excitación a los colorantes fluorescentes. Se toman imágenes de las señales fluorescentes mediante microscopios de fluorescencia. Se obtiene el nivel de expresión relativo de MAF en la muestra de tumor comparando la señal fluorescente en la muestra de tumor con la de una muestra de referencia. La intensidad en la muestra de tumor se correlaciona con la intensidad en la muestra de referencia, en la que una mayor intensidad en la muestra de tumor en comparación con la muestra de referencia se correlaciona con un riesgo aumentado de que el sujeto tenga metástasis de cáncer de mama primario en el hueso. Alternativamente, se determinan la amplificación o translocación del locus 16q22-24, del locus 16q23 o del gen MAF usando una técnica de hibridación *in situ* o similar

Basándose en el pronóstico de riesgo aumentado de metástasis ósea, al sujeto se le administra el anticuerpo anti-RANKL, denosumab, como tratamiento profiláctico para la metástasis ósea. Se administran 120 mg de denosumab al sujeto por vía subcutánea (s.c.) una vez al mes durante 6 meses, 120 mg por vía s.c. cada 3 meses durante los siguientes 4 años y medio, calcio por vía oral (al menos 500 mg) y vitamina D (al menos 400 U.I.) durante 5 años. Después de 5 años, el sujeto está libre de cualquier evidencia de metástasis ósea. Basándose en el pronóstico de la falta de un riesgo aumentado de metástasis ósea, al paciente no se le administra este anticuerpo anti-RANKL.

Se entiende que las realizaciones y los ejemplos descritos en el presente documento son solo con fines ilustrativos y que diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos se sugerirán a los expertos en la técnica y se incluirán en el espíritu y alcance de esta solicitud.

Tabla S1. Características de nivel inicial según CNA de 16q23

Características	Serie completa (n=334)		CNA de 16q23 < 1,5 (n=279)		CNA de 16q23 > o = 1,5 (n=279)		p
	N.º de pacientes	%	N.º de pacientes	%	N.º de pacientes	%	
Edad (mediana, intervalo)	58, 26-90		58, 31-90		58, 26-90		
Estado menopáusico							0,632
Premenopáusico	104	31,1	85	30,5	19	34,5	
Posmenopáusico	230	68,9	194	69,5	36	65,5	
Tamaño tumoral, mm							0,008
≤ 20	204	61,0	179	64,2	25	45,4	
21-50	100	30,3	80	28,7	20	36,4	
> 50	30	9,0	20	7,1	10	18,2	
Grado tumoral							0,011
I	57	17,0	52	18,6	5	9,1	
II	159	47,6	138	49,4	21	38,2	
III	118	35,3	89	32,0	29	52,7	
Ganglios linfáticos							0,091
Ninguno	203	60,7	175	62,7	28	50,9	
1-3	86	25,7	72	25,8	14	25,4	
4-9	29	8,6	21	7,5	8	14,6	
> 9	16	4,7	11	4,0	5	9,1	
Estado de receptor de estrógenos							0,174
Negativo	84	25,1	66	23,7	18	32,7	
Positivo	250	74,9	213	76,3	37	67,3	
Estado de receptor de progesterona							0,282
Negativo	118	35,3	95	34,0	23	41,8	
Positivo	216	64,6	184	66,0	32	58,2	
Estado de HER2							0,850
Negativo	271	81,2	227	81,4	44	80,0	
Positivo	63	18,8	52	18,6	11	20,0	
Met. ósea en cualquier momento							9e-12
Negativo	306	91,6	271	97,13	35	63,64	



Positivo (mediana de seguimiento, meses)	28	8,4	8 7,1	2,87	20 6,9	36,36	
Metástasis de tejido blando y visceral antes de met. ósea y muerte							0,998
Negativo	318	95,2	265	94,9	53	96,3	
Positivo	16	4,7	14	5,0	2	3,6	
Proliferación (Ki-67)							0,005
Baja proliferación (< 15%)	229	68,5	200	71,7	29	52,7	
Alta proliferación (≥ 15%)	84	25,1	62	22,22	22	40,0	
Proliferación (n.d.)	21	6,2	17	6,1	4	7,3	

Abreviaturas: HER2, receptor 2 de crecimiento epidérmico humano, n.d. no disponible

**Listado de secuencias**

- <110> Fundació Institut de Recerca Biomedica (IRB Barcelona) e Institutio Catalana de Recerca i Estudis Avancats  
GOMIS, Roger  
PLANET, Evarist
- 5 PAVLOVIC, Milica  
ARNAL, Anna  
TARRAGONA, Maria
- <120> MÉTODO PARA EL PRONÓSTICO Y EL TRATAMIENTO DE METÁSTASIS DE CÁNCER
- <130> 3190.011PC01/TJS/EJH
- 10 <140> Debe ser asignado  
<141> Con el presente documento  
<150> Documento 61/888.984  
<151> 09-10-2013  
<160> 13
- 15 <170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1  
<211> 6878  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*
- 20 <400> 1

ES 2 727 904 T3

agaggcttta	aaatcttttt	tcatcttcta	gctgtagctc	gggctgcttg	tcggcttggc	60
ctccccctcc	cccctttgct	ctctgcctcg	tctttcccca	ggacttcgct	atthttgcttt	120
tttaaaaaa	ggcaagaaag	aactaaactc	ccccctccct	ctcctccagt	cgggctgcac	180
ctctgccttg	cactttgcac	agaggtagag	agcgcgcgag	ggagagagag	gaaagaaaa	240
aaataataaa	gagagccaag	cagaagagga	ggcgagaagc	atgaagtgtt	aactcccccg	300
tgccaaggcc	cgcgccgccc	ggacagacgc	ccgccgcgcc	tccagccccg	agcggacgcc	360
gcgcgcgccc	tgctgcagc	ccgggcccgc	gaggcgagcc	cttccttatg	caaagcgcgc	420
agcggagcgg	cgagcggggg	acgccgcgca	ccgggcccgg	ctcctccagc	ttcgcccggg	480
cagccaccac	cgcgccacc	gcagctcgcg	gaggatcttc	ccgagcctga	agccgccggc	540
tcggcgcgca	aggaggcgag	cgagcaagga	ggggcccggg	cgagcgaggg	agcacattgg	600
cgtgagcagg	ggggagggag	ggcgggcgcg	gggggcgcgg	gcagggcggg	ggggtgtgtg	660
tgtgagcgcg	ctcggagggt	tcgggcccagc	caccgccgcg	caagctagaa	gcgccccagc	720
ccggcaagct	ggctcacccg	ctggccaccc	agcacagccc	gctggcccct	ctcctgcagc	780
ccatctggcg	gagcggcggc	ggcggcgcgc	gcggcggcag	gagaatggca	tcagaactgg	840
caatgagcaa	ctccgacctg	cccaccagtc	ccctggccat	ggaatatgtt	aatgacttcg	900
atctgatgaa	gtttgaagtg	aaaaaggaac	cggcggagac	cgaccgcac	atcagccagt	960
gcggccgtct	catcgccggg	ggctcgcctg	cctccacccc	catgagcacg	ccgtgcagct	1020

ES 2 727 904 T3

cgggtgcccc ttccccagc ttctcggcgc ccagcccggg ctcgggcagc gagcagaagg 1080  
 cgcacctgga agactactac tggatgaccg gctacccgca gcagctgaac cccgaggcgc 1140  
 tgggcttcag ccccgaggac gcggtcgagg cgctcatcag caacagccac cagctccagg 1200  
 gcggcttcga tggctacgcg cgcggggcgc agcagctggc cgcggcggcc ggggccggtg 1260  
 ccggcgctc cttgggcgcg agcggcgagg agatgggcc cgcgcgccgc gtggtgtccg 1320  
 ccgtgatcgc cgcggccgcc gcgcagagcg gcgcgggcc gcactaccac caccaccacc 1380  
 accacgccc cggccaccac caccaccga cggccggcgc gcccggccgc gcgggcagcg 1440  
 cggccgctc ggcgggtggc gctgggggcg cgggcggcgg tggcccggcc agcgtgggg 1500  
 gcggcgggcg cggcgggcgc ggcggaggcg gcggggcgc ggcggggcg gggggcgccc 1560  
 tgcaccgca ccacgcccgc ggcgcctgc acttcgacga ccgcttctcc gacgagcagc 1620  
 tggtgacct gtctgtcgc gagctgaacc ggcagctcgc cggggtcagc aaggaggagg 1680  
 tgatccgct gaagcagaag aggcggacc tgaaaaacc cggctatgcc cagtctgcc 1740  
 gcttcaagag ggtgcagcag agacacgtcc tggagtcgga gaagaaccag ctgctgcagc 1800  
 aagtcgacca cctcaagcag gagatctcca ggctggtcgc cgagaggac gcgtacaagg 1860  
 agaaatacga gaagtgtg agcagcggct tccgagaaa cggctcagc agcgacaacc 1920  
 cgtcctctcc cgagttttc atgtgagtct gacacgcgat tccagctagc caccctgata 1980  
 agtgctcgc gggggtccg ctcggtgtg ggcttgctag ttctagagcc atgctcgcca 2040  
 ccacctacc acccccacc ccaccgagtt tggccccctt ggccccctac acacacaaa 2100  
 acccgcacgc acacaccaca cacacacaca cacacacaca cacacccac accctgctcg 2160  
 agtttgggt ggtggtggct gtttaaaact ggggagggaa tgggtgtctg gctcatggat 2220  
 tgccaatctg aaattctcca taacttgcta gcttgTTTT ttttttttt tacaccccc 2280  
 cgccccacc ccggacttgc acaatgttca atgatctcag cagagttctt catgtgaaac 2340  
 gttgatcacc tttgaagcct gcatcattca catatTTTT cttcttcttc cccttcagtt 2400  
 catgaactgg tgttcatttt ctgtgtgtgt gtgtgtttta ttttgttg atttttttt 2460  
 ttaatTTT tac ttttagagct tgctgtgttg cccaccttt ttccaacct caccctcact 2520  
 ccttctcaac ccatctcttc cgagatgaaa gaaaaaaaa agcaaagtt tttttcttc 2580  
 tcctgagttc tcatgtgag attgagcttg caaagaaaa aaaaatgtga aatggtatag 2640  
 acttgacgcg tgccgagttc catcgggttt ttttttagc attgttatgc taaaatagag 2700  
 aaaaaaatcc tcatgaacct tccacaatca agcctgcac aaccttctgg gtgtgacttg 2760  
 tgagtttgg ccttgtgatg ccaaatctga gagtttagtc tgccattaa aaaactcatt 2820  
 ctcatctcat gcattattat gcttgctact ttgtcttagc aacaatgaac tataactggt 2880

ES 2 727 904 T3

tcaaagactt tatgaaaag agacattata ttaataaaaa aaaaaagcct gcatgctgga 2940  
catgtatggt ataattatth tttccttttt tttccttttt ggcttgaaa tggacgttcg 3000  
aagacttata gcatggcatt catacttttg ttttattgcc tcatgacttt tttgagttha 3060  
gaacaaaaca gtgcaaccgt agagccttct tcccatgaaa ttttgcatct gctccaaaac 3120  
tgctttgagt tactcagaac ttcaacctcc caatgcactg aaggcattcc ttgtcaaaga 3180  
taccagaatg ggttacacat ttaacctggc aaacattgaa gaactcttaa tgttttcttt 3240  
ttaataagaa tgacgccccca ctttggggac taaaattgtg ctattgccga gaagcagtct 3300  
aaaatttatt ttttaaaaag agaaactgcc ccattattht tggtttgttt tatttttatt 3360  
ttatatthtt tggcttttg tcatgtcaa atgtggaatg ctctgggttt ctagtatata 3420  
atthaattct agtttttata atctgttagc ccagttaaaa tgtatgctac agataaagga 3480  
atgttataga taaatttgaa agagttaggt ctgttttagct gtagatttht taaacgattg 3540  
atgcactaaa ttgtttacta ttgtgatggt aaggggggta gagtttgcaa ggggactggt 3600  
taaaaaaagt agcttataca gcatgtgctt gcaacttaaa tataagttgg gtatgtgtag 3660  
tctttgctat accactgact gtattgaaaa ccaaagtatt aagaggggaa acgcccctgt 3720  
ttatatctgt aggggtatth tacattcaaa aatgtatggt tttttttctt ttcaaaatta 3780  
aagtatttgg gactgaattg cactaagata taacctgcaa gcatataata caaaaaaaaa 3840  
ttgcaaaact gtttagaacg ctaataaaat ttatgcagtt ataaaaatgg cattactgca 3900  
cagttttaag atgatgcaga tttttttaca gttgtattgt ggtgcagaac tggattttct 3960  
gtaacttaaa aaaaaatcca cagtttttaa ggcaataatc agtaaatggt attttcaggg 4020  
actgacatcc tgtcttttaa aagaaatgaa aagtaaatct taccacaata aatataaaaa 4080  
aatcttgtca gttacttttc ttttacatat ttgctgtgac aaaattgttt tatatcttga 4140  
gttactaact aaccacgctt gttgttccta tgtgcttttc tttcattttc aattctgggt 4200  
atatcaagaa aagaataatc tacaataata aacggcattt ttttttgatt ctgtactcag 4260  
tttcttagtg tacagtttha ctgggccccaa caacctcgtt aaaagtgtaa aatgcatcct 4320  
tttctccagt ggaaggattc ctggaggaat agggagacag taattcaggg tgaaattata 4380  
ggctgttttt tgaagtgagg aggctggccc catatactga ttagcaatat ttaatataga 4440  
tgtaaattat gacctcattt ttttctcccc aaagttttca gttttcaaat gagttgagcc 4500  
ataattgccc ttggtaggaa aaacaaaaca aaacagtgga actaggcttc ctgagcatgg 4560  
ccctacactt ctgatcagga gcaaagccat ccatagacag aggagccgga caaatatggc 4620  
gcatcagagg tggcttgccg acatatgcat tgaacggtaa agagaaacag cgtttgcctt 4680  
ttcactaaag ttgactatth ttccttcttc tottacacac cgagattttc ttgttagcaa 4740  
ggcctgacaa gatttaacat aaacatgaca aatcatagtt gtttgttttg ttttgctttt 4800

ES 2 727 904 T3

ctctttaaca ctgaagatca tttgtcttaa ataggaaaa gaaaatccac tccttacttc 4860  
catatttcca agtacatata tggtttaaac tatgttatca aatcatatth caccgtgaat 4920  
attcagtgga gaacttctct acctggatga gctagtaatg atttcagatc atgctatccc 4980  
cagaaataaa agcaaaaaat aatacctgtg tggaatatag gctgtgcttt gatttactgg 5040  
tatttaccoc aaaataggct gtgtatgggg gctgacttaa agatcccttg gaaagactca 5100  
aaactacctt cactagtagg actcctaagc gctgacctat ttttaaatga cacaaattca 5160  
tgaaactaat gttacaaatt catgcagttt gcaactcttag tcatcttccc ctgacacacc 5220  
aatagaatgt tagacaaaag cagcaactgtt ttgaaaatac agccaaacac gatgactttt 5280  
gttttgtttt ctgccgttct taaaagaaaa aaagataata ttgcaactct gactgaaaga 5340  
cttattttta agaaaacaggt ttgtgtttggt tgctgctaag ttctggccag tttatcatct 5400  
ggccttctct cctatttttt acaaaacacg aagacagtgt gtaacctcga cattttgacc 5460  
ttcctttatg tgctagttht gacaggctcc tgaatccaca cttaattttg cttaacaaaa 5520  
gtcttaatat taaacctccc ctcatgagct tgaagtcaag tgttcttgac ttcagatatt 5580  
tctttctctt tttttttttt ttctcatca caactaagag atacacaaac tctgaagaag 5640  
cagaaatgga gagaatgctt ttaacaaaa agcatctgat gaaagatttt aggcaaacat 5700  
tctcaaaata agagtgatat tctggatgta gttattgcag ttatctcatg acaaatgagg 5760  
cctggattgg aaggaaaaata tagttgtgta gaattaagca ttttgatagg aatctacaag 5820  
gtagtgaat ataataagca ggtttgggoc cccaaacttt agaaaatcaa atgcaaagggt 5880  
gctggcaaaa atgaggtttg agtggctggc tgtaagagaa ggttaactcc tagtaaaagg 5940  
catttttaga aataacaatt actgaaaact ttgaagtata gtgggagtag caaacaata 6000  
catgtttttt ttttcttaca aagaactcct aaatcctgag taagtgccat tcattacaat 6060  
aagtctctaa atttaaaaa aaaaaaatca tatgaggaaa tctagctttc ccctttacgc 6120  
tgcgtttgat ctttgtctaa atagtgttaa aattcctttc attccaatta cagaactgag 6180  
cccactcgca agttggagcc atcagtggga tacgccacat tttggaagcc ccagcatcgt 6240  
gtacttacca gtgtgttcac aaaatgaaat ttgtgtgaga gctgtacatt aaaaaaatc 6300  
atcattatta ttattatttg cagtcacgga gaaccaccta cccctgactt ctgtttagtc 6360  
tcctttttaa ataaaaatta ctgtgttaga gaagaaggct attaaatgta gtagttaact 6420  
atgcctcttg tctggggggt tcatagagac cggtaggaaa gcgcaactcct gcttttcgat 6480  
ttatgggtgt tgcaagtaaa caggtgcatt gctttcaacc tgccatacta gttttaaaa 6540  
ttcactgaaa ttacaaagat acatatatat gcatatatat aatggaaagt ttcccggat 6600  
gcaacaatta gcattttaaa atcatatata ggcatgcaca ttctaaatag tactttttca 6660  
tgcttcattg tttctctggc agataattht actaagaaga aaaatagata ttcgactccc 6720  
cttccctaaa caaatccacg ggcagaggct ccagcggagc cgagccccct ggttttctcg 6780  
taggccctag acgggtgttc atttatcagt gatgtcaaac gtgctcattt gtcagacata 6840  
gctgtaaatg aaaacaatgt gtggcaaaat acaagtt 6878

<210> 2

<211> 2656

ES 2 727 904 T3

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

gaggctttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggcttggcc	60
tccccctccc ccctttgctc tctgcctcgt ctttccccag gacttcgcta ttttgctttt	120
ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcctccagtc gggctgcacc	180
tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa	240
aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccctg	300
gccaaaggccc gcgcgcgccg gacagacgcc cgccgcgcct ccagccccga gcggacgccg	360
cgcgcgccct gcctgcagcc cgggccggcg aggcgagccc tccttatgca aaagcgcgca	420
gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggccgggc tcctccagct tcgcccgcgc	480
agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct	540
cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggccggggc gagcgaggga gcacattggc	600
gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg ggggtgtgtgt	660
gtgagcgcgc tcggagggtt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cgccccagcc	720
cggcaagctg gctcaccgcg tggccaccca gcacagcccc ctggccccctc tcctgcagcc	780
catctggcgg agcggcggcg gcggcgcggc cggcgcgagg agaatggcat cagaactggc	840
aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttcga	900
tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatca tcagccagtg	960
cggccgtctc atcgccgggg gctcgtctgc ctccaccccc atgagcacgc cgtgcagctc	1020
ggtgccccct tccccagct tctcggcgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc	1080
gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcgag cagctgaacc ccgaggcgct	1140
gggcttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg	1200
cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggccg gggccggtgc	1260
cggcgcctcc ttggggcgga gcggcgagga gatgggcccc gccgcccggc tgggtgtccgc	1320
cgtgatcgcc gcggccggcg cgcagagcgg cgcgggcccc cactaccacc accaccacca	1380
ccacgcgcgc ggccaccacc accaccggac ggccggcgcg cccggcgccc cgggcagcgc	1440

ES 2 727 904 T3

ggccgcctcg gccggtggcg ctggggggcgc gggcggcggt ggcccggcca gcgctggggg 1500  
 cggcgcgggc gccggcgggc gcggagggcg cggggggcgc gcggggggcg ggggcgccct 1560  
 gcacccgcac cacgccggcg gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct 1620  
 ggtgaccatg tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcbc ggggtcagca aggaggaggt 1680  
 gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc ggctatgcc agtcctgccg 1740  
 cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca 1800  
 agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcbc gagagggacg cgtacaagga 1860  
 gaaatacagag aagttggtga gcagcggcct ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaaccc 1920  
 gtcctctccc gagtttttca taactgagcc cactcgcaag ttggagccat cagtgggata 1980  
 cgccacattt tggagcccc agcatcgtgt acttaccagt gtgttcacaa aatgaaattt 2040  
 gtgtgagagc tgtacattaa aaaaaatcat cattattatt attatttgca gtcattggaga 2100  
 accacctacc cctgacttct gtttagtctc ctttttaaat aaaaattact gtgttagaga 2160  
 agaaggctat taaatgtagt agttaactat gcctctgtc tgggggtttc atagagaccg 2220  
 gtaggaaagc gcactcctgc ttttcgattt atggtgtgtg caagtaaaca ggtgcattgc 2280  
 tttcaacctg ccatactagt tttaaaaatt cactgaaatt acaaagatac atatatatgc 2340  
 atatatataa tggaaagttt cccggaatgc aacaattagc attttaaaat catatatagg 2400  
 catgcacatt ctaaatagta ctttttcatg cttcattggt tctctggcag ataattttac 2460  
 taagaagaaa aatagatatt cgactcccct tccctaaca aatccacggg cagaggctcc 2520  
 agcggagccg agccccctgg ttttctcgta ggcctagac ggtggtgcat ttatcagtga 2580  
 tgtcaaacgt gctcatttgt cagacatagc tgtaaatgaa aacaatgtgt ggcaaaaatac 2640  
 aaagttaaaa aaaaaa 2656

<210> 3

<211> 6887

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

gaggctttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggcttggcc 60  
 tccccctccc ccctttgctc tctgcctcgt ctttccccag gacttcgcta ttttgctttt 120  
 ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcctccagtc gggctgcacc 180  
 tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa 240  
 aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccctg 300  
 gccaaaggccc gcgcgcggcg gacagacgcc cggcgcgcct ccagccccga gcggacggcg 360  
 cgcgcgccct gcctgcagcc cgggcccggcg aggcgagccc ttcttatgc aaagcgcgca 420

ES 2 727 904 T3

gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggccgggc tcctccagct tcgccgccgc 480  
 agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct 540  
 cggcgcgcaa ggagcggagc gagcaaggag gggccggggc gagcggaggga gcacattggc 600  
 gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg ggggtgtgtg 660  
 gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cgtcccagcc 720  
 cggcaagctg gctcaccgcg tggccacca gcacagcccg ctggcccctc tcctgcagcc 780  
 catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cggcggcagg agaatggcat cagaactggc 840  
 aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttcga 900  
 tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatca tcagccagtg 960  
 cggccgtctc atcgcggggg gctcgcgtgc ctccaccccc atgagcacgc cgtgcagctc 1020  
 ggtgccccct tccccagct tctcggcgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc 1080  
 gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcag cagctgaacc ccgaggcgct 1140  
 gggcttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg 1200  
 cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggccg gggccggtgc 1260  
 cgggcctcc ttggcgggca gcggcgaggga gatgggcccc gccgccgccg tgggtgccgc 1320  
 cgtgatcgcc gcggccgccg cgcagagcgg cgcgggcccc cactaccacc accaccacca 1380  
 ccacgccgcg ggccaccacc accaccgcac ggccggcgcg cccggcgcgg cgggcagcgc 1440  
 ggccgcctcg gccggtggcg ctggggggcg gggcggcggg ggcccggcca gcgctggggg 1500  
 cggcggcggc ggcggcggcg gcgggagcgg cgggggcgcg gcgggggcgg ggggcgcct 1560  
 gcaccgcac cacgccgccg gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct 1620  
 ggtgacctg tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggagg 1680  
 gatccggctg aagcagaaga ggcggacctt gaaaaaccgc ggctatgccc agtcctgccg 1740  
 cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgetgcagca 1800  
 agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcgc gagagggacg cgtacaagga 1860  
 gaaatacgag aagtgggtga gcagcggctt ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaaccc 1920  
 gtcctctccc gagtttttca tgtgagtctg acacgcgatt ccagctagcc accctgataa 1980  
 gtgetccgcg ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgetagt tctagagcca tgetcggcac 2040  
 cacctacca cccccaccc caccgagttt ggccccctt gccccctaca cacacacaaa 2100  
 cccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac acaccacaca ccctgctcga 2160  
 gtttgggtg gtggtggctg ttttaactg gggagggaaat ggggtgtctgg ctcatggatt 2220  
 gccaatctga aattctccat aacttctag ctgtttttt tttttttttt acaccccccc 2280  
 gccccacccc cggacttgca caatgttcaa tgatctcagc agagttcttc atgtgaaacg 2340



ES 2 727 904 T3

ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atatTTTTTtC ttcttcttcc ccttcagttc	2400
atgaactggg gtccattttc tgtgtgtgtg tgtgttttat tttgtttgga tttttttttt	2460
taatttttact tttagagctt gctgtgttgc ccaccttttt tccaacctcc accctcactc	2520
cttctcaacc catctcttcc gagatgaaag aaaaaaaaaa gcaaagtttt ttttcttct	2580
cctgagttct tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa aaaatgtgaa atgttataga	2640
cttgacgctg gccgagttcc atcgggtttt ttttttagca ttgttatgct aaaatagaga	2700
aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gcctgcatca accttctggg tgtgacttgt	2760
gagttttggc cttgtgatgc caaatctgag agtttagtct gccattaaaa aaactcattc	2820
tcatctcatg cattattatg cttgctactt tgtcttagca acaatgaact ataactgttt	2880
caaagacttt atggaaaaga gacattatat taataaaaaa aaaaagcctg catgctggac	2940
atgtatggta taattatttt ttcctttttt tttccttttg gcttggaat ggacgttcca	3000
agacttatag catggcattc atacttttgt tttattgcct catgactttt ttgagtttag	3060
aacaaaacag tgcaaccgta gagccttctt cccatgaaat tttgcatctg ctccaaaact	3120
gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgcaactga aggcattcct tgtcaaagat	3180
accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag aactcttaat gttttctttt	3240
taataagaat gacgccccac tttggggact aaaattgtgc tattgccgag aagcagtcta	3300
aaatttattt tttaaaaaga gaaactgcc cattatTTTTTt ggtttgTTTTt atttttattt	3360
tatatTTTTt ggcttttggt cattgtcaaa tgtggaatgc tctgggtttc tagtatataa	3420
tttaattcta gtttttataa tctgttagcc cagttaaaaa gtatgctaca gataaaggaa	3480
tgttatagat aaatttgaaa gagttaggtc tgttttagctg tagatTTTTt aaacgattga	3540
tgcactaaat tgtttactat tgtgatgta aggggggtag agtttgcaag gggactgttt	3600
aaaaaaagta gcttatacag catgtgcttg caacttaaat ataagttggg tatgtgtagt	3660
ctttgctata ccaactgactg tattgaaaac caaagtatta agaggggaaa cgcccctggt	3720
tatatctgta ggggtatttt acattcaaaa atgtatgttt ttttttcttt tcaaaaattaa	3780
agtatttggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag catataatac aaaaaaaaaat	3840
tgcaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagtta taaaaatggc attactgcac	3900
agttttaaga tgatgcagat ttttttacag ttgtattgtg gtgcagaact ggattttctg	3960
taacttaaaa aaaaatccac agttttaaag gcaataatca gtaaatgtta ttttcagggg	4020
ctgacatcct gtcttttaaaa agaaatgaaa agtaaatctt accacaataa atataaaaaa	4080
atcttgtcag ttacttttct tttacatatt ttgctgtgca aaattgtttt atatcttgag	4140
ttactaacta accacgctg ttgttcctat gtgcttttct ttcattttca attctgggta	4200

ES 2 727 904 T3

tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatttt tttttgattc tgtactcagt 4260  
 ttcttagtgt acagtttaac tgggcccaac aacctcgta aaagtgtaaa atgcatcctt 4320  
 ttctccagtg gaaggattcc tggaggaata gggagacagt aattcagggt gaaattatag 4380  
 gctgtttttt gaagtgagga ggctggcccc atatactgat tagcaatatt taatatagat 4440  
 gtaaattatg acctcatttt tttctcccca aagttttcag ttttcaaatg agttgagcca 4500  
 taattgccct tggtaggaaa aacaaaacaa aacagtggaa ctaggcttcc tgagcatggc 4560  
 cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga ggagccggac aaatatggcg 4620  
 catcagaggt ggcttgcgca catatgcatt gaacggtaaa gagaaacagc gcttgccttt 4680  
 tcaactaaagt tgactatttt tccttcttct cttacacacc gagattttct tgttagcaag 4740  
 gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagtgt tttgttttgt tttgcttttc 4800  
 tctttaacac tgaagatcat ttgtcttaaa taggaaaaag aaaatccact ccttacttcc 4860  
 atatttccaa gtacatatct ggtttaaact atgttatcaa atcatatttc accgtgaata 4920  
 ttcagtggag aacttctcta cctggatgag ctagtaatga tttcagatca tgctatcccc 4980  
 agaaaataaa gcaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg ctgtgctttg atttactggt 5040  
 atttacccca aaataggctg tgtatggggg ctgacttaaa gatcccttgg aaagactcaa 5100  
 aactaccttc actagtagga ctcctaagcg ctgacctatt tttaaatgac acaaattcat 5160  
 gaaactaatg ttacaaattc atgcagtttg cactcttagt catcttcccc tagcacacca 5220  
 atagaatggt agacaaagcc agcactgttt tgaaaataca gccaaacacg atgacttttg 5280  
 tttgttttc tgccgttctt aaaagaaaa aagataatat tgcaactctg actgaaagac 5340  
 ttatttttta gaaaacaggt tgtgtttggg gctgctaagt tctggccagt ttatcatctg 5400  
 gccttctctc ctattttttt caaaacacga agacagtgtg taacctcgac attttgacct 5460  
 tcctttatgt gctagttagt acaggctcct gaatccacac ttaattttgc ttaacaaaag 5520  
 tcttaatagt aaacctcccc tcatgagctt gaagtcaagt gttcttgact tcagatattt 5580  
 ctttctttt tttttttttt tcctcatcac aactaagaga tacacaaact ctgaagaagc 5640  
 agaaatggag agaatgcttt taacaaaaaa gcatctgatg aaagatttta ggcaaacatt 5700  
 ctcaaaaata gagtgatatt ctggatgtag ttattgcagt tatctcatga caaatgaggc 5760  
 ctggattgga aggaaaatat agttgtgtag aattaagcat tttgatagga atctacaagg 5820  
 tagttgaata taataagcag gtttgggccc ccaaacttta gaaaatcaa tgcaaagggtg 5880  
 ctggcaaaaa tgaggtttga gtggctggct gtaagagaag gtttaactcct agtaaaaggc 5940  
 atttttagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag tgggagtagc aaacaaatac 6000  
 atgtttttt tttcttacia agaactccta aatcctgagt aagtgccatt cattacaata 6060  
 agtctctaaa tttaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat ctagctttcc cctttacgct 6120

ES 2 727 904 T3

gcgtttgatac tttgtctaaa tagtggttaa attcctttca ttccaattac agaactgagc 6180  
 ccactcgcaa gttggagcca tcagtgggat acgccacatt ttggaagccc cagcatcgtg 6240  
 tacttaccag tgtgttcaca aaatgaaatt tgtgtgagag ctgtacatta aaaaaaatca 6300  
 tcattattat tattatttgc agtcatggag aaccacctac ccctgacttc tgtttagtct 6360  
 cctttttaaa taaaaattac tgtgttagag aagaaggcta ttaaattgtag tagttaacta 6420  
 tgcctcttgt ctggggggtt catagagacc ggtaggaaag cgcactcctg cttttcgatt 6480  
 tatggtgtgt gcaagtaaac aggtgcattg ctttcaacct gccatactag ttttaaaaat 6540  
 tcactgaaat taaaaagata catatatatg catatatata atggaaagt tcccggaatg 6600  
 caacaattag catttttaaa tcatatatag gcatgcacat tctaaatagt actttttcat 6660  
 gcttcattgt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa aaatagatat tcgactcccc 6720  
 ttccctaaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc gagccccctg gttttctcgt 6780  
 aggccctaga cgggtgttga tttatcagtg atgtcaaacg tgctcatttg tcagacatag 6840  
 ctgtaaatga aaacaatgtg tggcaaaata caaagttaa aaaaaaa 6887

<210> 4

<211> 403

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

ES 2 727 904 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Phe Phe Ile Thr Glu Pro Thr Arg Lys Leu Glu Pro Ser Val  
 370 375 380

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

Phe Thr Lys

<210> 5

ES 2 727 904 T3

<211> 373

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

ES 2 727 904 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Phe Phe Met  
 370

<210> 6

<211> 19

<212> ARN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ARNip específico de c-MAF

<400> 6

**acggcucgag cagcgacaa**

19

10 <210> 7

<211> 19

<212> ARN

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip específico de c-MAF	
	<400> 7	
5	<b>cuuaccagug uguucacaa</b>	19
	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> ARNip específico de c-MAF	
	<400> 8	
	<b>uggaagacua cuacuggaug</b>	20
	<210> 9	
15	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip específico de c-MAF	
20	<400> 9	
	<b>auuugcaguc auggagaacc</b>	20
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ARN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> ARNip específico de c-MAF	
	<400> 10	
	<b>caaggagaaa uacgagaagu</b>	20
30	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> ARNip específico de c-MAF	
	<400> 11	

**acaaggagaa auacgagaag**

**20**

<210> 12

<211> 20

<212> ARN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ARNip específico de c-MAF

<400> 12

**accuggaaga cuacuacugg**

**20**

10 <210> 13

<211> 13878

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 13



ES 2 727 904 T3

aactatatat taaacacctc cggctctgaga ggccgtggtg ggtgtctttg tcaggtgaag	60
aaagagaaga aggctggtac accttcccag gaattctcac tgaagaaaac atctggattt	120
tttacatctc ttgtgcaaaa caaacaaga tttcattaag tgatgtatat tgttttccaa	180
ggaagaaacc tgcagagaca aaaacaata agcaataat tgaacaaaa atagataaa	240
ccccaaatt cttccagtgc taatttactt gttatcatgg ttctctacaa aggcagagat	300
cactaattac aggtttttcc agaattcaca tttcacgtca agatcatcca atccaaacag	360
tgtacggaaa gcctagggcc ttcttcaact tgccccctac cccaccctac acacacgccc	420
ccatctaaat gatacccttg gaaagaaacc tacacatctc atttgtctat attttgcttc	480
ctccctcgcc tcccggtaac caaatgtgag ttgttctcta actgcactgg agaatcagaa	540
tttattgtac atatgtttgt gttccactta ataaaaaac ctatatttta agataaactt	600
tgtagtaaat tcatgaggta agtgactatt tatgctaadc aggcagaaat atattctcaa	660
gcataatgca ttacataaat ttgaatgtaa aatgttcaat tatgaagtaa atacaggtaa	720
tgcaataat aaattacctc taataaaaat tataaaagat gtgccttgaa agagagagcg	780
gctttaactt acaactgtga attgcttaaa gagaaaagaa ttaataaatg ctgaattact	840
ctgatgatta ttagcacat aattcaccta ttcataacga ctctagtaa tcagactggt	900
gtttcacatc ctccaacatg aggcaagact gtttcctcag caattttgcc cttatcagat	960
tatctcgtct gattctatta attttcttc atgaatctgc taacagtgat ttgtgattta	1020
cttaccctgc taactgaaga ctgttaaaag gatttatcta aactggacc taagaacagt	1080
gtacgcctta tcgttcagtt actctgaaga actctttctc aaatcaattt agttggtttc	1140
atagtgaat ttagtggaca ctggtagtt ctgcccata aaatcagccc ctaaacaag	1200
agtccagaca ccatacctga tgcacccat tctattcaga ttatggatgt ctgattccaa	1260
catgatatat ttgagttgct ataactcaca atcggggaaa atatattcct ttaagctttt	1320
aatctttgta atttggacat gaacaggggt tttgtttttc atttttgcat gaagtcatta	1380

ES 2 727 904 T3

tgtatgtact gacgtgaaac tataattgtg tttctgatgt tactgtgtca caatattcta 1440  
 tgcgatgtaa cccatgtcct cctccccctc acaaatctcc tataaatatt cattgctttc 1500  
 aaaaacttta atactactgg tccgaattgg tcaataatga caaatgcatg gtttctaaat 1560  
 tactgtatat tgtttctacag agattactag agtatatata gcaaggggat gttaagcagt 1620  
 aagaaaacac agttcacatt gtatttggat tagattggct tggatagaag tgaacaacac 1680  
 aatgttagca aagaagtcta aagacatgtg gccactgta attgtacaga atcaaaaacc 1740  
 tgaatagtag tcaataaaat gagagagctc aattgttata aaagaaatgc tgetaacaga 1800  
 gaactgtaaa tgttttagaca cccctgtgaa tcaactaaata ataatgtaaa aaggataaaa 1860  
 atgagaatta agttataagc ctgagagcat tactgtctaca catctaaaaa aataattctg 1920  
 atcctctctt ttttttttcc aagagaaaaat gggcgactat aaaagacctt gcaataagag 1980  
 aaataaaaat accatgtcct cacagcagtg tacataaata aaccataaaa atgtgcagat 2040  
 aataatatat ttagctgccc aaacatgggc atttaatttc tagaaatgat atataacaat 2100  
 gtaacaatta gatactcagc catgaatgtg tatggcacag tcttcatcat tagcaactt 2160  
 tgtgtataaa atattattta ttatttatta taatactgct ttcagaggca atgatcatac 2220  
 cttacagctt ttaacacaaa tatgatgcaa aaggattaaa agtatatcat aaacaaacaa 2280  
 taaattcttt ctaaatacac ttaaattcat attttcatg aaaaatataa acttcctaca 2340  
 tttgtgacta ctgactttta aaaagaccta gaaaactatt gttacgggca atgttaaag 2400  
 acataatgct tatgtaatgg aaagtgtgga ttttcctcta aataaactat aatcccttaa 2460  
 cttcattact agggaaaata ttgttaaaga gaaggaaagc aagggaatc tgetaggttg 2520  
 cataaatatt gacataatct tcaacttttc ttccccaaac tggtaataga catagtttat 2580  
 tccacccaac aaaatgctct tataagacca aaactaccct tattaacaac ttctctgcag 2640  
 tcacgatgaa aagaaacact acttgtctga aaaataccga cagcgctgcc cttttcagat 2700  
 taggggtgtc ctacgaatct tttggaagt cttccattaa ggattcctgg gtttgcagaa 2760  
 actgaagtct actaggatca gagaaattaa cacaggtcta atatggtgca aggaacgagt 2820  
 gagagacacc tgaggttata aatagcaaag catgctgcgg ggtggggaag accattctga 2880  
 agtgcaatgt tcaagacgct ggcttaatat atgactaagt gtcagaagtc aggttttctg 2940  
 agaattactt tccagataaa caactttata gcaactgcaact taatcttact tactagagac 3000  
 atctcattta tcaactgaatt acaagtaact ttaatcctat tgatattgcc ataaagcccg 3060  
 ttgaaaatcc atcctggcac ttttaaaggg tttggggccc tgttacatgg ggatcctctt 3120  
 gcaaaaggct cagccagaaa ttacaccccg aggggtgtctg tatcccctgg cctctttgtc 3180  
 aacaatcaag gagaagagga ggggcaaaaa tgatctctgc atctgccagc actttctctg 3240  
 gccctttcc tatagggtcg ggttctccca cttcagtcaa actaactttg tgtgtctctt 3300

ES 2 727 904 T3

tcctcctccc	acactgggta	accagctgct	tttcacttca	tcgacaaaac	tggacacgga	3360
tcaatttcaa	ctgacctttg	ccgaaagggtg	gcgctgttga	ggtaaaaacc	aactcgctcc	3420
aacaatagtt	tccactcttc	gatccttttg	caggcttttc	agaatttttt	ttttttttta	3480
atgcaccctc	ctagcgtctc	ccccttctca	taaagtaaaa	taaatacgat	taaaaacacc	3540
aatgcattt	cattaattga	aggaatcaac	agtcccaact	tctaagcaga	cggtctggtc	3600
ttccaaggc	tgggtcgggt	tcaggagctt	tctctccaaa	taaactctctg	cttcttcgac	3660
ttgcctatcg	ctttaaaatc	ttagaaacag	agttagtgtg	tgttttcctt	cttttttctt	3720
tttctttttt	atctcttttt	tgcataaact	tttagagaat	caatctagaa	atttgaacta	3780
cttattagca	tttgcaactg	gggtggggg	gagcagcctc	ccccaccca	ccccccactc	3840
tgcgtttccg	gactagtctc	agaaaccgcg	gtttaaaatt	taacccttcg	agggtagctg	3900
gtgagggctg	gggtattggt	tttccccctt	gctccctgcc	acgatcaagt	ccgaaataat	3960
taaaggaaac	gtaaaagtgc	aaagggcgcg	cctgaccctg	ataaacagag	gtcagatttc	4020
gtaaggggac	gggtgagtgt	gagtgtgtgt	gtgtttgtgt	gtgtgtgtgt	aagagagaga	4080
gagagcgagc	gcgcaatatg	agtctcaaag	gccaaactcc	ggccagtcag	gagccggaag	4140
gctgagcccc	gctgacctga	ctttgagctt	ccccggagtt	atctcgcata	ggcgctcgct	4200
ctgtccaagg	gcacgcgacg	ccagcgggca	gccggtctcc	gtgaagaatg	gcctctaac	4260
aacttatttt	acctcgttgt	aaagagaggg	ataaaatggg	ctttccctct	ccacggatgc	4320
ccagccttct	gggcagggcg	atggccgggc	ggcgcccagc	ccgcagcccc	gatccggaca	4380
ccccactgca	tcctctcctt	ccccgtccct	tccccgcaag	ggcgcccag	agacggacaa	4440
agagttgggg	ccaagtttga	gcgcccgggca	cggccaggct	caggggaagga	aggtccccgg	4500
cagacacctg	ggtaccagag	ttgtgctgag	gaggaaaagc	tgggagggca	attcacaatc	4560
ctgggggtgg	agggcaggca	ggggagggga	atcaggccaa	tcccagccga	gtgagcccc	4620
agcgagctgg	ggctccggat	gggagcctg	tctcgcgctc	caaagaaaag	caaaccgccc	4680
tcccagggtcc	gcccggattg	ccgaagcccc	tctggaaaaa	ctccttcccc	tcttacacca	4740
aactttgcgc	cgggcctcgt	tcctcccgg	gtaggcagcg	gcgcaggaag	ggttaagcca	4800
gcccgtccca	gctgacagtc	agctgattgg	gccctgattg	acagctccga	aaagtttctt	4860
tgtttctata	ctattatgct	aatcggggcc	gctctcgccg	cctcccattg	gcccggagtg	4920
ccagtcaatt	tctcatttgg	acctgacgtc	acgagtgcta	taaaactcag	caattgcttt	4980
aaactcttct	tgctggatca	gaggctttaa	aatctttttt	catcttctag	ctgtagctcg	5040
ggctgcttgt	aggtctggcc	tccccctccc	ccctttgctc	tctgcctcgt	ctttccccag	5100
gacttcgcta	ttttgctttt	ttaaaaaaag	gcaagaaaga	actaaactcc	cccctccctc	5160

ES 2 727 904 T3

tcctccagtc gggctgcacc tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg 5220  
 gagagagagg aaagaaaaaa aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca 5280  
 tgaagtgtta actccccctg gccaaaggccc gcgccgcccg gacagacgcc cgcgcgcctt 5340  
 ccagccccga gcggacgccg cgcgcgcctt gcctgcagcc cgggcccggc aggcgagccc 5400  
 ttcttatgac aaagcgcgca gcggagcggc gagcggggga cgcgcgcac cgggcccggc 5460  
 tcctccagct tcgccgccgc agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc 5520  
 cgagcctgaa gccgcgggct cggcgcgcaa ggaggcagc gagcaaggag gggcggggc 5580  
 gagcagggga gcacattggc gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg 5640  
 cagggcgggg ggggtgtgtgt gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc 5700  
 aagctagaag cgcgccagcc cggcaagctg gctcaccgc tggccacca gcacagccc 5760  
 ctggcccctc tcctgcagcc catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cggcggcagg 5820  
 agaatggcat cagaactggc aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg 5880  
 gaatatgtta atgacttcca tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc 5940  
 gaccgcatca tcagccagtg cggccgtctc atcgccgggg gctcgtctgc ctccaccccc 6000  
 atgagcacgc cgtgcagctc ggtgccccct tccccagct tctcggcgc cagcccgggc 6060  
 tcgggcagcg agcagaaggc gcacctgaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcag 6120  
 cagctgaacc ccgagggcgt gggcttcagc cccgagagc cggtcgaggc gctcatcagc 6180  
 aacagccacc agctccaggg cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc 6240  
 gcggcggcgg gggcgggtgc cggcgcctcc ttgggcggca gcggcgagga gatgggcccc 6300  
 gccgcgcggc tgggtgtccgc cgtgatcgcc gcggccgccg cgcagagcgg cgcgggcccg 6360  
 cactaccacc accaccacca ccacgcgccg gccaccacc accaccggac gccggcgcgc 6420  
 cccggcgcgg cgggcagcgc ggccgcctcg gccggtgggc ctgggggcgc gggcggcggg 6480  
 ggcccggcca gcctgggggg cggcggcggc ggccggcggc gcggagggcg cgggggcgcg 6540  
 gcgggggcgg ggggcgcctt gcaccgcac cacgccgccg gcggcctgca cttcagcagc 6600  
 cgcttctccg acgagcagct ggtgaccatg tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcgc 6660  
 ggggtcagca aggaggaggat gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc 6720  
 ggctatgccc agtcctgccg cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag 6780  
 aagaaccagc tgctgcagca agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctgggtgcgc 6840  
 gagagggacg cgtacaagga gaaatacagc aagtttgtga gcagcggcct ccgagaaaac 6900  
 ggctcagca gcgacaacc gtccctccc gagttttca tgtgagtctg acacgcgatt 6960  
 ccagctagcc accctgataa gtgctccgcg ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgetagt 7020  
 tctagagcca tgctcgcac cacctacca ccccccccc caccgagttt ggccccctg 7080

ES 2 727 904 T3

gccccctaca cacacacaaa cccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac 7140  
 acaccccaca ccctgctcga gtttgtgggt gtgggtggctg ttttaaactg gggagggaaat 7200  
 ggggtgtctgg ctcatggatt gccaatctga aattctccat aacttgctag cttgtttttt 7260  
 tttttttttt acaccccccc gccccacccc cggacttgca caatgttcaa tgatctcagc 7320  
 agagtctctc atgtgaaacg ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atattttttc 7380  
 ttcttcttcc ccttcagttc atgaactggg gttcattttc tgtgtgtgtg tgtgttttat 7440  
 tttgtttgga tttttttttt taattttact tttagagctt gctgtgttgc ccaccttttt 7500  
 tccaacotcc acocctcactc cttctcaacc catctcttcc gagatgaaag aaaaaaaaaa 7560  
 gcaaagtttt tttttcttct cctgagttct tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa 7620  
 aaaatgtgaa atgttataga cttgcagcgt gccgagttcc atcgggtttt ttttttagca 7680  
 ttgttatgct aaaatagaga aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gcctgcatca 7740  
 accttctggg tgtgacttgt gagttttggc cttgtgatgc caaatctgag agtttagtct 7800  
 gccattaaaa aaactcattc tcatctcatg cattattatg cttgctactt tgtcttagca 7860  
 acaatgaact ataactgttt caaagacttt atggaaaaga gacattatat taataaaaaa 7920  
 aaaaagcctg catgctggac atgtatggta taattatfff ttcctttttt tttccttttg 7980  
 gcttggaat ggacgttcga agacttatag catggcattc atacttttgt tttattgcct 8040  
 catgactfff ttgagtttag acaaaaacag tgcaaccgta gagccttctt cccatgaaat 8100  
 tttgcatctg ctccaaaact gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgcaactga 8160  
 aggcattcct tgtcaaagat accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag 8220  
 aactcttaat gttttctttt taataagaat gacgccccac tttggggact aaaattgtgc 8280  
 tattgccgag aagcagtcta aaatttattt tttaaaaaga gaaactgcc cattatfff 8340  
 ggtttgttt atfffattt tatatfff ggcttttggc cattgtcaa tgtggaatgc 8400  
 tctgggttc tagtatataa ttttaattcta gttttataa tctgttagcc cagttaaaat 8460  
 gtatgctaca gataaaggaa tgttatagat aaatttгаа gagttaggtc tgtttagctg 8520  
 tagatfff aaacgattga tgcactaaat tgtttactat tgtgatgta agggggtag 8580  
 agtttgcaag gggactgtt aaaaaagta gcttatacag catgtgcttg caacttaaat 8640  
 ataagttggg tatgttagt ctttctata ccactgactg tattgaaaac caaagtatta 8700  
 agaggggaaa cgcccctgtt tatatctgta ggggtatfff acattcaaaa atgtatgtt 8760  
 tttttctt tcaaaattaa agtatttggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag 8820  
 catataatac aaaaaaaaaat tgcaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagtta 8880  
 taaaaatggc attactgcac agttttaaga tgatgcagat ttttttacag ttgtattgtg 8940

ES 2 727 904 T3

gtgcagaact ggatthttctg taacttaaaa aaaaatccac agthtttaag gcaataatca 9000  
gtaaatgtta thttcagggg ctgacatcct gtctthtaaaa agaaatgaaa agtaaatctt 9060  
accacaataa atataaaaa atcttgctag ttactthttct thtacctatt ttgctgtgca 9120  
aaattgttht atatcttgag ttactaacta accacgcgtg ttgttcctat gtgctthttct 9180  
ttcatthttca attctgggta tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcattht 9240  
thtttgattc tgtactcagt thcttagtgt acagthtaac tgggccaac aacctcgtta 9300  
aaagtgtaaa atgcatcctt thctccagtg gaaggattcc tggaggaata gggagacagt 9360  
aattcagggg gaaattatag gctgtthttt gaagtgggga ggctggcccc atatactgat 9420  
tagcaatatt taatatagat gtaaattatg acctcattht thtctcccca aagthttcag 9480  
thttcaaatg agttgagcca taattgccct tggtaggaaa acaaaaaca aacagtggaa 9540  
ctaggctthc tgagcatggc cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga 9600  
ggagccggac aaatatggcg catcagaggt ggcttgcgca catatgcatt gaacggtaaa 9660  
gagaaacagc gcttgccctt tcactaaagt tgactattht tccttcttct cttacacacc 9720  
gagatthttct tgttagcaag gcctgacaag atthaacata aacatgaca atcatagttg 9780  
thttgtthtgt thtgcctthc thtttaacac tgaagatcat ttgtcttaaa taggaaaaag 9840  
aaaaatccact ccttactthc atatthtcaa gtacatatct ggtthaaact atgttatcaa 9900  
atcatatthc accgtgaata thcagtggag aactthtcta cctggatgag ctagtaatga 9960  
thtcagatca tgctatcccc agaaataaaa gcaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg 10020  
ctgtgcttht atthactggg atthaccccc aaataggctg tgatggggg ctgactthaa 10080  
gatcccttg aaagactcaa aactaccttc actagtagga ctctaagcg ctgacctatt 10140  
thtaaatgac acaaatthcat gaaactaatg thacaaatthc atgcagtht cactcttagt 10200  
catctthccc tagcacacca atagaatgth agacaaagcc agcactgtht tgaaaatata 10260  
gccaacacag atgacttht thttgttht tgcctthctt aaaaagaaaa aagataatat 10320  
tgcaactctg actgaaagac thattthttaa gaaaacaggt tgtgtthtggg gctgctaagt 10380  
tctggccagt thtcatctg gcctthctgc ctatthttht caaacacga agacagtgtg 10440  
taacctcgac atthtgacct thctthtatt gctagthttag acaggctcct gaatccacac 10500  
thaatthtgc thaacaaaag thttaatagt aaacctcccc thcatgactt gaagtcaagt 10560  
gthcttgact tcagatatth ctthcttht thttthttht thctcatcac aactaagaga 10620  
tacacaaact ctgaagaagc agaatggag agaatgctth taacaaaaa gcatctgatg 10680  
aaagatthta ggcaaacatt ctcaaaaata gagtgatatt ctggatgtag thattgcagt 10740  
tatctcatga caaatgaggc ctggattgga aggaaaatat agthtgttag aattaagcat 10800  
thtgatagga atctacaag tagthtgaata taataagcag gthtggcccc ccaacttht 10860

ES 2 727 904 T3

gaaaatcaaa tgcaaagtg ctggcaaaaa tgaggtttga gtggctggct gtaagagaag 10920  
gttaactcct agtaaaaggc attttagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag 10980  
tgggagtagc aaacaaatac atgttttttt tttcttacia agaactccta aatcctgagt 11040  
aagtgccatt cattacaata agtctctaaa tttaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat 11100  
ctagctttcc cctttacgct gcgtttgatc tttgtctaaa tagtgttaaa attcctttca 11160  
ttccaattac agaactgagc cactctgcaa gttggagcca tcagtgggat acgccacatt 11220  
ttggaagccc cagcatcgtg tacttaccag tgtgttcaca aaatgaaatt tgtgtgagag 11280  
ctgtacatta aaaaaaatca tcattattat tattatttgc agtcatggag aaccacctac 11340  
ccctgacttc tgtttagtct cctttttaaa taaaaattac tgtgttagag aagaaggcta 11400  
ttaaagttag tagttaacta tgcctcttgt ctgggggttt catagagacc ggtaggaaag 11460  
cgcactcctg cttttcgatt tatggtgtgt gcaagtaaac aggtgcattg ctttcaacct 11520  
gccatactag ttttaaaaat tactgaaat tacaagata catatatatg catatatata 11580  
atggaaagtt tcccggaatg caacaattag ctttttaaaa tcatatatag gcatgcacat 11640  
tctaaatagt actttttcat gcttcattgt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa 11700  
aaatagatat tcgactcccc ttccctaaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc 11760  
gagccccctg gttttctcgt aggcctaga cgggtgtgca tttatcagtg atgtcaaacg 11820  
tgctcatttg tcagacatag ctgtaaatga aaacaatgtg tggcaaaaata caaagttagt 11880  
taaatacaca ccctctgtgt gattttttgc tcccttttct tttttgctcc tactcaaaaa 11940  
aaaaaaaaat acctccttta catttcctg gcttcttgca tgtttccctt ttcaaaaacc 12000  
atgtaataat tttttacaat gtatctgaca cattaatata ttgacatcaa ataggcagac 12060  
attctacttt tgctctgcaa ataaatctgc tacggagaca tcatttcctc actgtctcaa 12120  
agccataact acctgggagt ctttcaacac agaccctcc gatgggaaat gctgtttatt 12180  
actgaatgca ggatgctcac gctctgatct tttctccctt gtgcctttac ccagtcatt 12240  
tttacttagc aacaccaatt ctagatactt ctgttctgaa gtagaaccac ccccttgcca 12300  
cactgccagt tttctgcta aaagcagtgg acagaagaca gatcatggct accctcacia 12360  
acatggcaca cagctgtctc ggtagctgca tcccagcat gtcctggctc aaatatctag 12420  
agttgcctat gacacgttca aaggttcca agcacagtac attgggaggc ttttgctgct 12480  
gtggccggtg ttttctgcta ggccaactta cttccgtatt cacatactct tggctttacg 12540  
aaatacactc ctccagtcta ctaggccaat caatatattt aaaagtctga ttgccacata 12600  
agtctctctc tctctctttt tgttttttgt ttgtttgttt tttctgttt tggctgccgg 12660  
tagttaaaga ctgagatag ttggaagact aaaatacagg agtacetgag tgacaacctt 12720

ES 2 727 904 T3

cagccgtctg atttccatgc cggtaaaaca cacaaccaag ctcttcttag cgctgcta	12780
ataaacattc actaagaggg aataggaagt gagatttacc agcttcactt tgctgattg	12840
caaggttccc cactacgatt cactgtcatt tgatttttga aaaataattt tgtccgtctc	12900
tttgaagaaa tgtcttagtt cttttatctt gtttgtttgg ttttttttag agaagtttta	12960
tctgcagtga taggctacaa tttttatctc cgctgattat ttgtcaggat gctgaatgaa	13020
taatttggtc ctgtgccttc cttggtgttc tgaggaaaat aagagaaact tggaagttg	13080
tttactcctt agcccacctt aatctaaaa gaagatgtcc caggtccagg caggccatgt	13140
agtagttata aaggaggtgg tccagggtcca gccacctcaa tcaggatttg tttgttttga	13200
agcatttgct taaaagcggg gcaagagtct taaccctact tgccataaca ctgcttttct	13260
cgcttttgat gtaaactctc aaaattcaga catcaaacag cccagaaaa ggggaattct	13320
ctccaggcat tgctcgcgcc cagctcctga acaaaccag ctctgtctag ctttttttc	13380
cctagcgggg gtaggggaca gggtgagaga atttcagtct cccaggctgt ctcatgattg	13440
ttagggcata aagaaacaca gtctgtccac aaattgggag catctttacc ctttagagag	13500
aaacaaaaca aactaaaca aacaaatcaa attgctttgc atgaaggcgt agcaaataaa	13560
atctcgggct cctgttccc tgcaccattt gtaggaggtg agaaatgagg gaaacaagag	13620
aaaggggaac tttaaaagcg ggaggcccag aaataatccc tgttaccagt ctgaatttca	13680
cttgctcogt ggctaacgtc agacctagtg tgcatgtatg ccagaagtaa actaggctcg	13740
gctgtccatt tctttaaaat atgttcacat gtttcctttt tgaaaacaat tttggggact	13800
aaacccaaat ggagagattt gaggaaatcg ttaatgtctt aacatttgag tatatttata	13860
aatgtatcag tctgtgat	13878

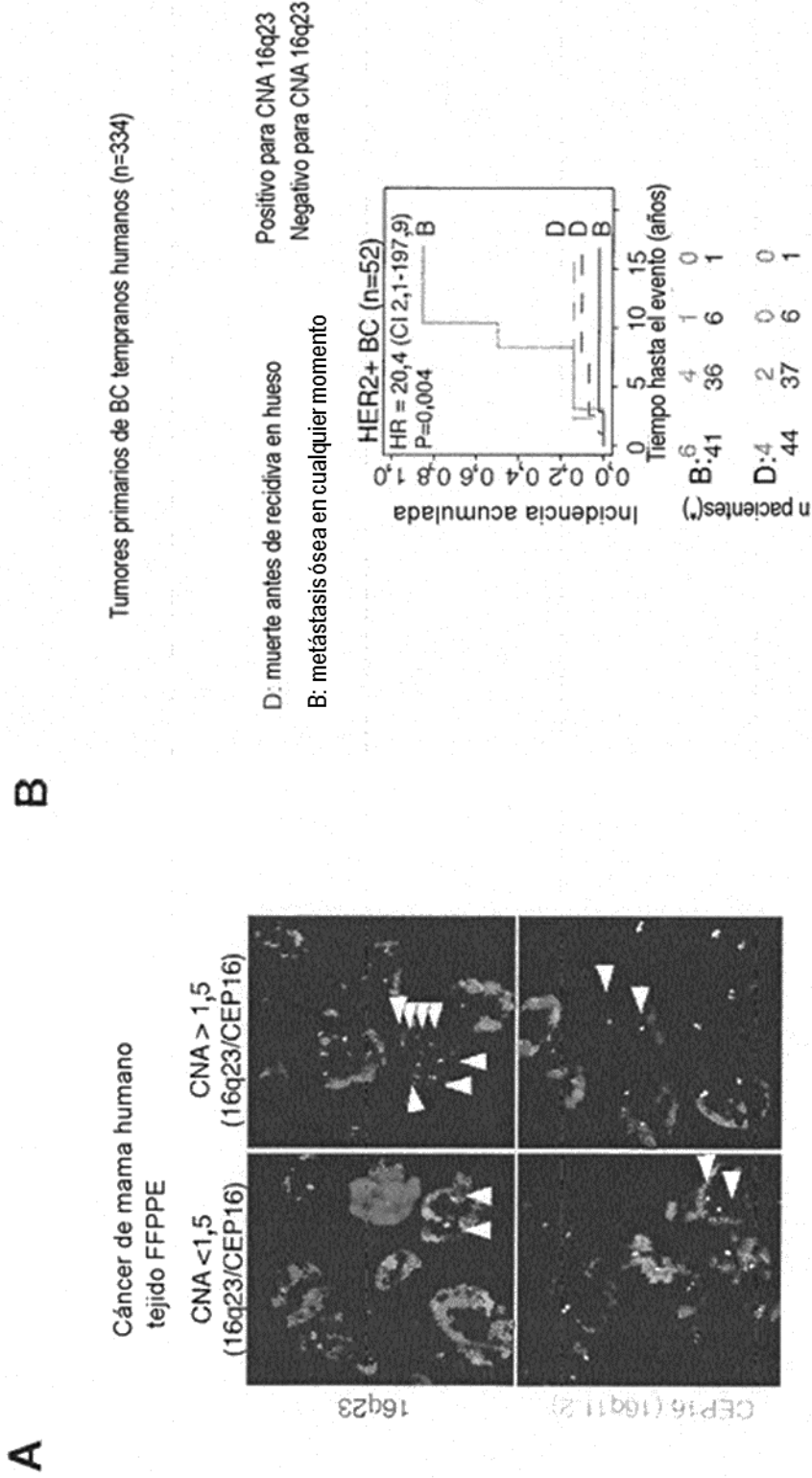


## REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para predecir el riesgo de metástasis ósea de un cáncer de mama HER2+ y/o el desenlace clínico de un cáncer de mama HER2+ en un sujeto que padece dicho cáncer, que comprende
  - 5 i) determinar la amplificación o el número de copias del gen MAF en una muestra de cáncer de mama HER2+ de dicho sujeto y
  - ii) comparar la amplificación o el número de copias obtenido en la etapa i) con un valor de referencia, en el que el aumento del número de copias o el grado de amplificación de dicho gen con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de un riesgo aumentado de desarrollar una metástasis ósea y/o un mal desenlace clínico.
- 10 2. Método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto que padece cáncer de mama HER2+, que comprende
  - i) cuantificar la amplificación o el número de copias del gen MAF en una muestra de cáncer de mama HER2+ de dicho sujeto y
  - 15 ii) comparar la amplificación o el número de copias obtenido en i) con un valor de referencia, en el que si el número de copias o el grado de amplificación está aumentado con respecto a dicho valor de referencia, dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia que tiene como objetivo prevenir y/o tratar una metástasis ósea y/o una terapia que tiene como objetivo evitar y/o prevenir la degradación ósea,
  - 20 en el que si el número de copias o el grado de amplificación no está aumentado con respecto a dicho valor de referencia, dicho sujeto no es susceptible de recibir una terapia para prevenir y/o tratar una metástasis ósea y/o una terapia para evitar y/o prevenir la degradación ósea.
3. Método *in vitro* para predecir el riesgo de metástasis ósea según la reivindicación 1, en el que un número de copias o un grado de amplificación de dicho gen por encima del valor promedio más una desviación estándar es indicativo de un riesgo aumentado de metástasis ósea temprana.
- 25 4. Método según la reivindicación 2, en el que la terapia para evitar o prevenir la degradación ósea se selecciona del grupo que consiste en un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, un inhibidor de PTH, un inhibidor de PTHLH, un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor dual de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógenos, calcitonina, radio 223 y un inhibidor de la catepsina K y/o la terapia para prevenir y/o tratar una metástasis se selecciona del grupo que consiste en: un agente inhibidor de c-MAF, tratamientos sistémicos incluyendo pero sin limitarse a: quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia,
- 30 radioterapia, cirugía, un inhibidor de mTor, un inhibidor de la cinasa Src, un antagonista de CCR5, un inhibidor de la COX-2 y Alpharadin.
5. Método según la reivindicación 4, en el que el inhibidor de RANKL se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo específico de RANKL, un nanocuerpo específico de RANKL, osteoprotegerina, el bisfosfonato ácido zoledrónico y el inhibidor dual de MET y VEGFR2 cabozantinib.
- 35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que determinar la amplificación o el número de copias de MAF comprende cuantificar el número de copias o la amplificación de la proteína codificada por dicho gen o de una variante del mismo, en el que el número de copias o la amplificación de la proteína se cuantifica por medio de inmunotransferencia de tipo Western, ELISA, FISH, inmunohistoquímica o un alineamiento de proteína o la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dicho gen, o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario (ADNc) de dicho gen, o un fragmento de dicho ADNc.
- 40 7. Método *in vitro* para predecir el riesgo de metástasis ósea y/o predecir el desenlace clínico de cáncer de mama HER2+ según la reivindicación 1, que comprende determinar si el gen MAF está amplificado en la muestra de cáncer de mama HER2+ de dicho sujeto en relación con un número de copias del gen de referencia, en el que una amplificación del gen MAF con respecto a dicho número de copias del gen de referencia es indicativa de un riesgo aumentado de desarrollar una metástasis ósea y/o un mal desenlace clínico.
- 45 8. Agente que puede evitar o prevenir la degradación ósea para su uso en la prevención, inhibición o el tratamiento de una metástasis ósea de cáncer de mama HER2+ o evitar o prevenir la degradación ósea en cáncer de mama HER2+ en un sujeto que se ha identificado que tiene una amplificación del gen MAF o un número de copias aumentado en comparación con un valor de referencia, en el que el agente que puede evitar o prevenir la degradación ósea se selecciona del grupo que consiste en un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, un inhibidor de PTH o PTHLH, incluidos los anticuerpos bloqueantes, o formas recombinantes de los mismos, un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor dual de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógenos, calcitonina, un inhibidor de la catepsina K y Alpharadin.
- 50

- 5 9. Agente que puede evitar o prevenir la degradación ósea para su uso en el tratamiento, la inhibición o prevención de una metástasis ósea de cáncer de mama HER2+ o degradación ósea según la reivindicación 8, en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, un inhibidor de la PTH, un inhibidor de la PTHLH o un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de la DKK-1, un inhibidor dual de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógenos, calcitonina, radio 223 y un inhibidor de la catepsina K.
- 10 10. Agente que puede evitar o prevenir la degradación ósea para su uso en el tratamiento, la inhibición o prevención de una metástasis ósea de cáncer de mama HER2+ o degradación ósea según la reivindicación 9, en el que el inhibidor de RANKL se selecciona del grupo de un anticuerpo específico de RANKL, un nanocuerpo específico de RANKL, osteoprotegerina, el bisfosfonato ácido zoledrónico y el inhibidor dual de MET y VEGFR2 cabozantinib.
11. Método *in vitro* para tipificar una muestra de un sujeto que padece cáncer de mama HER2+, comprendiendo el método:
- 15 (a) proporcionar una muestra de cáncer de mama HER2+ de dicho sujeto;
- (b) cuantificar la amplificación o el número de copias de MAF en dicha muestra;
- (c) tipificar dicha muestra comparando la amplificación cuantificada o el número de copias de MAF cuantificado con un nivel de referencia de MAF predeterminado;
- en el que dicha tipificación proporciona información de pronóstico relacionada con el riesgo de metástasis ósea en dicho sujeto.
- 20 12. Método para clasificar a un sujeto que padece cáncer de mama HER2+ en una cohorte, que comprende: a) determinar la amplificación o el número de copias de MAF en una muestra de cáncer de mama HER2+ de dicho sujeto; b) comparar la amplificación o el número de copias de MAF en dicha muestra con un nivel de referencia de MAF predeterminado; y c) clasificar dicho sujeto en una cohorte basándose en dicha amplificación o dicho número de copias de MAF en la muestra.

25



**FIG. 1**