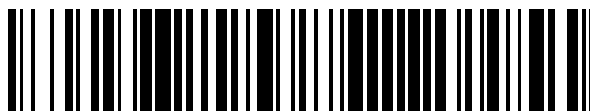


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 107**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/IB2013/001204**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13153458**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13731875 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 2836837**

54 Título: **Método para el pronóstico y tratamiento de metástasis de cáncer**

30 Prioridad:

09.04.2012 US 201261621949 P

09.04.2012 EP 12382139

09.11.2012 US 201261724807 P

30.11.2012 US 201261732175 P

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

09.12.2020

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA
(IRB BARCELONA) (50.0%)**

**Parc Científic de Barcelona, C. Baldiri Reixac, 10-12
08028 Barcelona, ES y
INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS
AVANÇATS (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 798 107 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 metástasis de cáncer

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

La presente invención se refiere al pronóstico de la metástasis ósea en cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) basándose en la determinación de los niveles del gen c-MAF, amplificación o translocación del locus 16q23 o 16q22-24 en una muestra de tumor primario. Asimismo, la invención también se refiere a un método para diseñar una terapia personalizada en un sujeto con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), que comprende la determinación de los niveles de expresión del gen c-MAF, amplificación o translocación del locus 16q23 o 16q22-24. Finalmente, la invención se refiere al uso de un inhibidor de c-MAF como agente terapéutico en el tratamiento de metástasis de cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), en particular metástasis ósea.

Técnica anterior

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

El cáncer de mama se clasifica en estadios según el sistema TNM (véase American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer Staging Manual. 6ª ed. Nueva York, NY: Springer, 2002). El pronóstico está íntimamente relacionado con los resultados de la clasificación en estadios, y la clasificación en fases también se usa para asignar pacientes a tratamientos tanto en ensayos clínicos como en la práctica médica. La información para clasificar en estadios es como sigue:

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

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

Todas las células tienen receptores en su superficie, en su citoplasma y en el núcleo celular. Ciertos mensajeros químicos tales como las hormonas se unen a dichos receptores y esto provoca cambios en la célula. Son tres los receptores importantes que pueden afectar a las células de cáncer de mama: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y HER2/neu. Para el fin de nombrar las células que tienen alguno de estos receptores, se les coloca un signo positivo para el receptor presente y un signo negativo si está ausente: ER positivo (ER+), ER negativo (ER-), PR positivo (PR+), PR negativo (PR-), HER2 positivo (HER2+) y HER2 negativo (HER2-). El estado del receptor se ha convertido en una evaluación crítica de todos los cánceres de mama, ya que determina la idoneidad del uso de tratamientos específicos, por ejemplo, tamoxifeno o trastuzumab.

Estudios de perfiles de alineamientos de expresión génica no supervisados han proporcionado evidencias biológicas de la heterogeneidad del cáncer de mama a través de la identificación de subtipos intrínsecos tales como luminal A, luminal B, HER2 + / ER- y el subtipo de tipo basal.

Los cánceres triple negativos se definen como tumores que no expresan los genes para el receptor de estrógeno (ER), para el receptor de progesterona (PR), ni para el HER2. Este subgrupo representa el 15% de todos los tipos de cáncer de mama y un porcentaje más alto de cáncer de mama que surge en mujeres africanas y afroamericanas que son premenopáusicas. Los cánceres de mama triple negativos tienen un patrón de recaída que es muy diferente de los cánceres de mama positivos para receptores de estrógenos: el riesgo de recaída es mucho mayor en los primeros 3-5 años, pero después de ese periodo cae en forma abrupta y es sustancialmente inferior al riesgo de recaída para el cáncer de mama positivo para el receptor de estrógeno.

El subtipo de tipo basal se caracteriza por una baja expresión tanto del grupo de genes de ER como de HER2, por lo que es típicamente ER-negativo, PR-negativo y HER2-negativo en las pruebas clínicas; por esta razón, se conoce a menudo como cáncer de mama "triple negativo" (Breast Cancer Research 2007, 9 (Suppl 1): S13). Los cánceres de tipo basal expresan genes que normalmente se encuentran en las células "basales"/mioepiteliales de la mama normal, incluyendo citoqueratinas de alto peso molecular (5/6, 14 y 17), P-cadherina, caveolinas 1 y 2, nestina, α B cristalino, receptor del factor de crecimiento epidérmico (Reis-Fiho J. *et al.*, <http://www.uscap.org/site/~98th/pdf/companion03h03.pdf>).

Dado que no existe una definición internacionalmente aceptada para el cáncer de mama de tipo basal, no es de extrañar que se haya producido una gran confusión en cuanto a si los cánceres de mama triple negativos y de tipo basal son sinónimos. Aunque varios grupos han usado estos términos indistintamente, cabe señalar que no todos los tipos de cáncer de tipo basal carecen de ER, PR y HER2 y que no todos los tipos de cáncer triple negativo presentan un fenotipo de tipo basal. La gran mayoría de los cánceres triple negativos presentan un fenotipo de tipo basal. Asimismo, la gran mayoría de los tumores que expresan marcadores "basales" son triple negativos. Hay que señalar, sin embargo, que hay un número significativo de cánceres triple negativos que no expresan marcadores basales y un subgrupo pequeño, pero todavía significativo, de cánceres de tipo basal que expresan cualquiera de los receptores de hormonas o HER2. Bertucci *et al* (Int J Cancer 01 de julio de 2008; 123 (1):236-40) se han ocupado de este asunto directamente, y confirmaron que cuando se analizan los perfiles de expresión génica no todos los tumores triple negativos se clasifican como de tipo basal (es decir, sólo el 71% eran de fenotipo de tipo basal) y no todos los carcinomas de mama basales, clasificados por alineamientos de expresión, presentaban un fenotipo triple negativo (es decir, el 77%).

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

En la actualidad, ensayos de PCR tales como Oncotype DX o ensayos de microalineamientos como MammaPrint pueden predecir el riesgo de recaída del cáncer de mama basándose en la expresión de determinados genes. En febrero de 2007, el ensayo MammaPrint se convirtió en el primer indicador de cáncer de mama en conseguir autorización oficial de la Agencia de medicamentos y alimentación estadounidense.

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

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

La solicitud de patente US2010/0210738 se refiere a un método para el pronóstico del cáncer en un sujeto con cáncer de mama triple negativo que comprende la detección en una muestra de los niveles de expresión de una serie de genes que se regulan positivamente o se regulan negativamente al azar.

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

Existe la necesidad de identificar nuevos marcadores que permitan predecir la probabilidad de desarrollar metástasis en sujetos que padecen cáncer de mama triple negativo. La identificación de nuevos factores de pronóstico servirá para guiar en la selección de los tratamientos más adecuados.

5 Sumario de la invención

En un aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir metástasis ósea de un cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) en un sujeto que padece dicho cáncer, que comprende

- 10 i) determinar el nivel de expresión, o amplificación del gen c-MAF en una muestra de dicho sujeto y,
- ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de referencia o la amplificación obtenida en la etapa i) con un número de copias de gen de referencia,
- 15 en el que un nivel de expresión incrementado de dicho gen con respecto a dicho valor de referencia o amplificación incrementada de dicho gen con respecto a un número de copias de gen de referencia es indicativo de riesgo incrementado de desarrollar metástasis ósea.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) que comprende,

- 20 i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF o amplificación en una muestra de dicho sujeto y
- ii) comparar el nivel de expresión obtenido en i) con un valor de referencia, o la amplificación obtenida en i) con un número de copias de referencia,
- 25 en el que

- si el nivel de expresión está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, o la amplificación es amplificación incrementada con respecto a dicho número de copias de gen de referencia, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia para prevenir y/o tratar metástasis ósea.

- si el nivel de expresión no está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, o la amplificación no está incrementada con respecto a dicho número de copias de gen de referencia, entonces dicho sujeto no es susceptible de recibir una terapia para prevenir y/o tratar la metástasis ósea.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) con metástasis ósea que comprende,

- 40 i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF, o amplificación en una muestra de tejido metastásica ósea de dicho sujeto y
- ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa (i) con un valor de referencia, o la amplificación obtenida en la etapa (i) con un número de copias de gen de referencia,
- 45 en la que

- si el nivel de expresión del gen c-MAF está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, o la amplificación del gen c-MAF está incrementada con respecto a dicho número de copias de gen de referencia, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia para prevenir la degradación ósea,

- si el nivel de expresión del gen c-MAF no está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, o la amplificación del gen c-MAF no está incrementada con respecto a dicho número de copias de gen de referencia, entonces dicho sujeto no es susceptible de recibir una terapia para prevenir la degradación ósea.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir metástasis ósea de un cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), en un sujeto que padece dicho cáncer que comprende determinar si el gen c-MAF está amplificado en una muestra de dicho sujeto en relación a un número de copias de gen de referencia, en el que una amplificación del gen c-MAF con respecto a dicho número de copias de gen de referencia es indicativo de un mayor riesgo de desarrollar metástasis ósea.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir metástasis ósea de un cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) en un sujeto que padece dicho cáncer que comprende determinar si el gen c-MAF está translocado en una muestra de dicho sujeto, en el que una translocación del gen c-MAF es indicativa de un riesgo incrementado de metástasis ósea.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir el resultado clínico de un paciente que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) que comprende la determinación de si el gen c-MAF está amplificado en una muestra de dicho sujeto en relación con un número de copias de gen de referencia, en el que una amplificación del gen c-MAF con respecto a dicho número de copias de gen de referencia es indicativo de un mal resultado clínico.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir el resultado clínico de un paciente que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), que comprende la determinación de si el gen c-MAF está translocado en una muestra de dicho sujeto, en el que una translocación del gen c-MAF es indicativa de un mal resultado clínico.

En otro aspecto, la invención se refiere a un agente inhibidor de c-MAF para su uso en el tratamiento o la prevención de metástasis ósea de cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), en el que dicho agente inhibidor de c-MAF se selecciona del grupo que consiste en un ARNip específico de c-MAF, un oligonucleótido antisentido específico de c-MAF, una ribozima específica de c-MAF, un nanocuerpo o anticuerpo inhibidor de c-MAF, una variante de c-MAF dominante negativa, un compuesto de la tabla 1 o de la tabla 2, ARN catalítico, una enzima de ADN, un péptido inhibidor, una molécula pequeña específica de c-MAF, un anticuerpo específico de c-MAF, una molécula de tipo anticuerpo específico de c-MAF, un péptido estructuralmente limitado (cíclico) específico de c-MAF, un péptido grapado específico de c-MAF o un alfacuerpo específico de c-MAF.

En otro aspecto, la invención se refiere a un agente capaz de evitar o prevenir la degradación ósea para su uso en el tratamiento de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) y que tiene niveles de c-MAF elevados en una muestra de metástasis con respecto a una muestra de control, en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, inhibidor de PTH y PTHLH o un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor doble de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógeno, calcitonina, radio-223 y un inhibidor de la catepsina K.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para tipificar una muestra de un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), comprendiendo el método:

(a) cuantificar el nivel de expresión o amplificación de c-MAF en una muestra proporcionada a partir de un paciente;

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

en donde dicha tipificación proporciona información pronóstica en relación con el riesgo de metástasis ósea en dicho sujeto.

En otro aspecto, la invención se refiere a un agente que previene o reduce la metástasis ósea para su uso en la prevención de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), en el que dicho sujeto se ha identificado que tiene un nivel de expresión de c-MAF incrementado en una muestra con respecto a un valor de referencia y en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en un agente inhibidor de c-MAF, un inhibidor de mTor, un inhibidor de cinasa Src, un inhibidor de COX-2, un antagonista de CCR5 y/o dicloruro de radio-223.

En otro aspecto, la invención se refiere a un agente inhibidor de c-MAF para su uso en el tratamiento de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), y que tiene niveles de c-MAF elevados en una muestra de metástasis con respecto a una muestra de control.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir el resultado clínico de un paciente que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) con metástasis ósea, que comprende

(a) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de dicho sujeto y

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

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

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Gráficas de densidad de cada puntuación. ESR1, ERBB2, PGR, LUMINAL, PROLIFERACIÓN.

Figura 2: Gráficas de Kaplan-Meier del tiempo hasta la metástasis ósea para pacientes con cáncer de mama triple negativo (triple negativo) (valor de $p=0,04$). Los grupos de cada gráfica se definen por los niveles de c-MAF. (-), (uk)

y (+) representan niveles de expresión c-MAF de la siguiente manera: (-) ($< \text{media} - \text{DE}$), (uk) ($\geq \text{media} - \text{DE}$ y $\leq \text{media} + \text{DE}$) y (+) ($> \text{media} + \text{DE}$). DE significa desviación estándar.

Figura 3. c-MAF (ARNm) es un biomarcador clínico para metástasis ósea de cáncer de mama en cáncer de mama ER+.

Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de metástasis ósea (izquierda), cerebral (arriba a la derecha) y pulmonar (abajo a la derecha) en pacientes con cáncer de mama primario ER+ (unión del conjunto de datos GSE2603, GSE2034 y GSE12276 o cohorte I). Bajo, medio y alto representan niveles de expresión de c-MAF de la siguiente manera: bajo ($< \text{media} - \text{DE}$), medio ($\geq \text{media} - \text{DE}$ y $\leq \text{media} + \text{DE}$) y alto ($> \text{media} + \text{DE}$). Se ha retirado a los pacientes con metástasis ósea del análisis de metástasis cerebral y pulmonar.

Figura 4. c-MAF (proteína) es un biomarcador clínico para la metástasis ósea de cáncer de mama

a) Inmunotinciones de c-MAF representativas de tejidos primarios de cáncer de mama. El caso 1 representa tumores negativos para c-MAF (DO $<$ 1000). El caso 2 y el caso 3 son tumores positivos para MAF (DO $>$ 1000 y $>$ 25000 respectivamente).

b) El gráfico representa la expresión proteica de c-MAF (DO) en una cohorte de 380 tumores de cáncer de mama primarios (cohorte II). Los tumores se segregan según el subtipo de BC (ER+, HER2+ y TN). Las señales grises en la parte inferior representan un tumor con metástasis ósea. Densidad óptica DO basándose en inmunotinción de c-MAF.

c, d) Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad (c) y supervivencia libre de metástasis ósea (d) en una cohorte de 380 tumores de cáncer de mama primarios (estadio I, II y III). Grupo alto de c-MAF (línea roja, DO $>$ 1000); grupo bajo de c-MAF (línea verde, DO $<$ 1000).

e) Tabla que representa el rendimiento diagnóstico de metástasis ósea de c-MAF en diferentes subtipos de BC (ER+, HER2+ y TN). IC (intervalo de confianza); Se- sensibilidad; Sp- especificidad; VPP (valor pronóstico positivo); VPN (valor pronóstico negativo).

Figura 5: Contribución de c-MAF a la metástasis ósea de células de cáncer de mama.

a) Células MCF7 parentales con o sin expresión de c-MAF (isoformas corta y larga) se inyectaron en el ventrículo izquierdo de un ratón y se analizó la colonización del hueso por imágenes de bioluminiscencia *in vivo*. Se muestran gráficos de Kaplan-Meier de supervivencia libre de metástasis ósea. Se muestran imágenes correspondientes al total del flujo de fotones, tinciones de H&E y tomografías computarizadas de huesos representativos en el criterio de valoración.

b) Células T47D parentales con o sin expresión de c-MAF (isoformas corta y larga) se inyectaron en el ventrículo izquierdo de un ratón y se analizó la colonización del hueso por imágenes de bioluminiscencia *in vivo*. Se muestran gráficos de Kaplan-Meier de supervivencia libre de metástasis ósea.

c) Derivados de células MCF7 con metástasis ósea BoM2 agotadas o rescatadas para la expresión de c-MAF (isoformas corta y larga combinadas o por separado) se inyectaron en el ventrículo izquierdo de un ratón y se analizó la colonización del hueso por imágenes de bioluminiscencia *in vivo*. Se muestran gráficos de Kaplan-Meier de supervivencia libre de metástasis ósea. Se muestran imágenes correspondientes al total del flujo de fotones, tinciones de H&E y tomografías computarizadas de huesos representativos en el criterio de valoración.

d) Células MCF7 parentales con o sin expresión de c-MAF (isoformas corta y larga) se inyectaron a través de la vena de la cola de un ratón y se analizó la colonización del pulmón por imágenes de bioluminiscencia *in vivo*. Se muestran gráficos de Kaplan-Meier de supervivencia libre de metástasis de pulmón. Las diferencias estadísticas se determinaron por la prueba de los signos con rango de Wilcoxon.

Figura 6. Niveles de MAF en derivados de MCF7 metastásicos óseos y parentales BoM2.

a) Niveles de expresión de MAF en células parentales transfectadas con constructos de expresión de isoforma de control, c-MAF corta, c-MAF larga o c-MAF corta y larga (izquierda) y en células de control BoM2, MAF sh o BoM2 de rescate (derecha). Los niveles de expresión de MAF larga se determinaron usando una sonda TaqMan y se normalizaron a niveles de Bo2M. Los niveles endógenos de MAF corta se determinaron usando reacción Syber Green con cebadores indicados y se normalizaron a niveles de ACTINA beta. Se detectó la presencia de isoforma corta de c-MAF expresada ectópicamente usando reacción PCR.

b) WB que representa niveles de proteína c-MAF en células que sobreexpresan isoforma de control parental, MAF corta y MAF larga (simultáneamente) y en células de control BoM2, MAF sh o BoM2 de rescate. Se usó α -TUBULINA como control de carga.

c) Comparación de la expresión de proteína y ARNm de c-MAF directa entre MCF7, BoM2 y BoM2 agotado en MAF, tal como se describe en a) y b).

d) Actividad de renilla del plásmido indicador C-MARE (elemento sensible a c-MAF) en células parentales transfectadas transitoriamente con vectores que expresan control, isoforma corta de c-MAF, isoforma larga de c-MAF o isoforma larga y corta de c-MAF. La actividad del promotor C-MARE se normaliza a la condición de control y se presenta en unidades arbitrarias. Los datos son la media de tres experimentos independientes con DE.

Figura 7. MAF dirige la metástasis ósea en modelos experimentales de ratones con metástasis de cáncer de mama

(Izquierda) Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de metástasis ósea. Se inyectaron células que sobreexpresan control parental e isoforma c-MAF corta y c-MAF larga en el ventrículo izquierdo y la metástasis se determinó por bioluminiscencia. (Derecha) Se muestran imágenes de bioluminiscencia representativas el día 0 y en el criterio de valoración, día 54, con tomografías computarizadas representativas de extremidades posteriores de ratones y tinción de H&E de metástasis ósea para cada grupo. Barras de escala, 100 μ m. Área osteolítica, línea discontinua amarilla. (Derecha) El total de flujo de fotones de las extremidades posteriores *ex vivo* se midió en el criterio de evaluación, día 54, y se normalizó al día 0. Los valores de P se calcularon comparando las células parentales transfectadas con vectores de expresión de control y c-MAF corta y c-MAF larga simultáneamente (izquierda) o por separado (derecha).

Figura 8. c-MAF es un mediador causal de metástasis de cáncer de mama al hueso.

Se muestra un gráfico de imágenes de bioluminiscencia del desarrollo de metástasis ósea. Los valores se normalizan al día 0. Se inyectaron células control, MAF sh o BoM2 de rescate en el ventrículo izquierdo de ratones desnudos.

Se calcularon las estadísticas incluyendo solo animales que recayeron con metástasis ósea.

Figura 9. c-MAF desencadena la diferenciación de osteoclastos en lesiones metastásicas óseas de cáncer de mama.

a) Porcentaje de lesiones osteolíticas (medidas por rayos X) por número total de lesiones óseas (medidas por luminiscencia). Se inyectaron células parentales que expresan parental, c-MAF corta, c-MAF larga y c-MAF corta y larga y derivados de células MCF7 metastásicas óseas BoM2 en el ventrículo izquierdo de un ratón y se analizó la colonización ósea mediante imágenes de bioluminiscencia *in vivo*.

b) Ensayo de diferenciación de osteoclastos a partir de células precursoras derivadas de médula ósea de ratón usando medio condicionado originado a partir de células parentales MCF7 o células que sobreexpresan cualquiera de las isoformas de c-MAF (isoforma corta - corta e isoforma larga - larga). El número de osteoclastos se mide mediante la técnica TRAP (>3 células multinucleadas).

c y d) Tinción TRAP de lesiones metastásicas óseas representativas de ratones en los que se inyectaron de manera intracardiaca células parentales que expresan parental, c-MAF corta, c-MAF larga y c-MAF corta y larga y derivados de células de MCF7 metastásicas óseas BoM2. Las células osteoclasticas positivas para TRAP (morado) a lo largo de la interfaz tumoral ósea se contaron en al menos cuatro campos diferentes de cuatro ratones independientes y se representaron gráficamente con valores de DE. Barra de escala 50 μ m. Las diferencias estadísticas entre grupos se evalúan mediante la prueba de Wilcoxon de dos colas.

Figura 10. c-MAF no soporta la proliferación del cáncer de mama

Representación esquemática de la inyección subcutánea. (Arriba) Curvas de crecimiento de tumores subcutáneos de células que sobreexpresan control parental o isoforma c-MAF corta y c-MAF larga (simultáneamente). Los valores representan la media con DE. (Abajo) Porcentaje de células positivas para Ki67 en tumores subcutáneos de células que sobreexpresan control o isoforma c-MAF corta y c-MAF larga (simultáneamente). Para cada tumor se contaron un mínimo de diez campos aleatorios para células positivas para Ki67. Los valores son medias con DE. (n=4)

Figura 11: PTHLH aguas abajo de c-MAF contribuye a y media en la metástasis ósea de cáncer de mama

a) Niveles de expresión relativos de PTHLH en células parentales que sobreexpresan parental, c-MAF corta, c-MAF larga y c-MAF corta y larga, y derivados de células MCF7 metastásicas óseas BoM2 normalizados al nivel de expresión de B2M. * Valor de $p < 0,05$.

b) Gráfico de puntos de la expresión normalizada de *MAF* frente a la expresión normalizada de *PTHLH* en metástasis de cáncer de mama humano a partir del conjunto de datos GSE14020. Los puntos rojos representan metástasis ósea mientras que los puntos negros representan otras metástasis de tejidos blandos. Las líneas de puntos representaban la expresión promedio de *MAF* o *PTHLH* en muestras de metástasis.

c) Células de médula ósea tratadas con medio condicionado (CM) y de diferenciación de osteoclastos 50:50, células

parentales que expresan parental, c-MAF corta y larga y derivados de células MCF7 metastásicas óseas BoM2 o sin CM pero con péptido antagonista de PTHLH humano (7-34) (5 µg/ml). El número de osteoclastos se mide por medio de la técnica TRAP (osteoclastos son >3 células multinucleadas, destacadas por flechas blancas) y se normaliza al control.

d) Se inyectaron células parentales que expresan parental, c-MAF corta y larga etiquetadas con el gen de luciferasa en el ventrículo izquierdo de ratón y se analizó la colonización ósea mediante imágenes de bioluminiscencia *in vivo*. Los ratones en los que se inyectaron células parentales que expresan c-MAF corta y larga se trataron o no con péptido antagonista de PTHLH (7-34) inoculado por vía intraperitoneal (6 µg/animal) dos veces al día durante el transcurso del experimento. El gráfico representa el total de flujo de fotones *ex vivo* en el criterio de valoración del experimento, que refleja el número de células metastásicas por lesión (panel izquierdo). Se representan lesiones de metástasis óseas osteolíticas (panel derecho).

e) Imágenes de rayos X (tomografía computarizada) de lesiones osteolíticas representativas por grupo. Se representaron células osteoclasticas positivas para TRAP (negras, resaltadas por flechas blancas) a lo largo de la interfaz tumoral ósea para los diferentes grupos. Las células osteoclasticas positivas para TRAP (negro) a lo largo de la interfaz tumoral ósea de lesiones se contaron en al menos cuatro campos diferentes de cada ratón por separado y se representaron gráficamente con valores de DE. Barra de escala 50 µM. Las diferencias estadísticas entre grupos se evalúan mediante la prueba de Wilcoxon de dos colas.

Figura 12. Estimación de la relación entre la expresión de c-MAF y la razón de riesgo de metástasis ósea a través de un modelo de regresión de Cox con splines cuadráticos (función SmoothCoxph en el paquete PhenoTest). Los gráficos corresponden a los grupos que se indican: la razón HR y el valor de p de la capacidad de c-MAF para predecir la metástasis ósea de tumores cuyos niveles de expresión de c-MAF están por encima del promedio (denominado 0) (unión del conjunto de datos GSE2603, GSE2034 y GSE12276, cohorte I). 1 en los niveles de expresión indica 1 desviación estándar posteriormente.

Figura 13. Determinación de la expresión de c-MAF y riesgo de metástasis ósea. Se sometió a ensayo en la cohorte de validación II hasta qué punto es mayor el riesgo de recaída ósea con una dosis de c-MAF mayor. Se cuantificó la expresión de c-MAF por inmunohistoquímica (IHC) mediante la determinación de la densidad óptica de la tinción usando un sistema computarizado descrito anteriormente (figuras 4a, b). Basándose en los dos tipos de tumores de cáncer de mama positivos para c-MAF, se pueden separar en dos grupos ya que tienen un comportamiento bimodal (panel izquierdo). A partir de estas dos categorías, se valida la observación de que cuanto mayor es la tinción de c-MAF, mayor es el riesgo de metástasis ósea (HR (metástasis óseas) = 19,45; valor de p<0,001) y más pronto tiene lugar la metástasis ósea (panel derecho).

Figura 14. Gráfica que muestra los resultados de una prueba exacta de Fisher para someter a prueba la independencia de c-MAF y la metástasis ósea en los diferentes puntos de tiempo (unión del conjunto de datos GSE2603, GSE2034 y GSE12276, cohorte I). Las proporciones de la tabla de contingencia y los valores de p de la prueba exacta de Fisher se indican en cada panel.

Figura 15. La sobreexpresión de c-MAF puede producirse debido a alteraciones del número de copias

a) Análisis de la alteración del número de copias basándose en expresión génica (algoritmo ACE). El área sombreada representa la amplificación genómica del ADN asociada significativamente con recaída en tumores de cáncer de mama ER+ (unión del conjunto de datos GSE2603, GSE2034 y GSE12276, cohorte I).

b) Panel que representa el porcentaje de células metastásicas óseas parentales y BoM2 con la amplificación génica de *MAF* basándose en la razón entre copias génicas de *MAF* (16q23) y copias génicas de *IGH* (14q32). Imágenes representativas de células parentales y BoM2 teñidas con FISH.

c) Para el cromosoma 16, los puntos negros y las líneas horizontales grises representan razones y segmentos de intensidad log2 normalizados, respectivamente. BoM2 se comparan con las células parentales MCF7. En la parte inferior, en gris se destaca la amplificación genómica del ADN 16q22-24.

Figura 16. La amplificación de la región de ADN genómico 16q22-24 se asocia con metástasis ósea de cáncer de mama

a y b) Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de metástasis ósea (a) o supervivencia global (bt) en el conjunto de tumores primarios humanos con estadio de BC I, II y III (n=334) (cohorte II). Los pacientes se estratificaron según el grupo negativo para FISH 16q23 y positivo para FISH 16q23 basándose en el corte de 2,5 copias de 16q23 por célula como promedio, usando 3 núcleos por tumor. Se, sensibilidad; Sp, especificidad; HR, razón de riesgo.

c) Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de metástasis ósea para pacientes positivos para ER (izquierda) o triple negativos (derecha) en el conjunto de tumores primarios humanos de BC I, II y III (n=250 y n=43 respectivamente) (de la cohorte II). Los pacientes se dividieron en grupo negativo para FISH 16q23 y positivo para FISH 16q23

basándose en el corte de 2,5 copias de 16q23 por célula como promedio, usando 3 núcleos por tumor. HR, razón de riesgo.

d, e) Curvas de características operativas del receptor (ROC) para el rendimiento diagnóstico de la amplificación de 16q23 en cáncer de mama global (d) y ER+ (e). En una curva ROC, la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) se representa gráficamente en función de la tasa de falsos positivos (100-especificidad) para diferentes puntos de corte. Cada punto de la curva ROC representa un par de sensibilidad/especificidad que corresponde a un umbral de decisión particular.

10 Descripción detallada de la invención

Definiciones de expresiones y términos generales.

Tal como se usa en el presente documento, "agente para evitar o prevenir la degradación de los huesos" se refiere a cualquier molécula capaz de prevenir, inhibir, tratar, reducir o detener la degradación del hueso ya sea mediante la estimulación de la proliferación de osteoblastos, como inhibiendo la proliferación de osteoclastos o fijando la estructura ósea.

Tal como se usa en el presente documento, el término "amplificación de un gen" se refiere a un proceso mediante el cual varias copias de un gen o de un fragmento del gen se forman en una célula individual o una línea celular. Las copias del gen no necesariamente se encuentran en el mismo cromosoma. La región duplicada a menudo se conoce como un "amplicón". Normalmente, la cantidad de ARNm producido, es decir, el nivel de expresión génica, también aumenta en proporción al número de copias de un gen particular.

Tal como se usa en el presente documento, el término "de tipo basal", "subtipo de tipo basal", "cáncer de mama del subtipo de tipo basal" y similares, tal como se usan en el presente documento, se refiere a un subtipo particular de cáncer de mama que se caracteriza por los dos receptores negativos ER y HER2 y al menos un receptor positivo del grupo que consiste en CK5/6, CK14, CK17 y EGFR. Así, todas las oraciones de la presente solicitud que citan y se refieren al cáncer de mama triple negativo (ER, HER-2, PgR) también pueden citarse y referirse a cáncer de mama de tipo basal en el que ER y HER2 son negativos y en el que al menos uno de CK5/6, CK14, CK17 y EGFR es positivo. Alternativamente, "de tipo basal" también se refiere a cáncer de mama caracterizado por un perfil de expresión génica basado en la regulación positiva y/o regulación negativa de los siguientes diez genes: (1) Forkhead box IC (FOXC 1), (2) actividad inhibidora de melanoma (MIA), (3) homólogo de NDC80, componente del complejo cinetocoro (KNTC2), (4) proteína centrosomal de 55 kDa (CEP55), (5) anilina, proteína de unión a actina (ANLN), (6) cinasa de cremallera de leucinas embrionaria materna (MELK); 7) receptor acoplado a proteínas G 160 (GPR160); 8) proteína transmembrana 45B (TMEM45B); (9) receptor de estrógeno 1 (ESR1); (10) Forkhead box A1 (FOXA1). Debido a que el perfil de expresión génica utilizado para clasificar los tumores de cáncer de mama como subtipo de tipo basal no incluye el receptor de estrógeno, el receptor de progesterona ni HER2, tanto los cánceres de mama triple negativos como no triple negativos pueden clasificarse como subtipo de tipo basal.

Tal como se usa en el presente documento, "cáncer de mama triple negativo" se refiere a un cáncer de mama que se caracteriza por una falta de expresión detectable de tanto ER como PR (preferiblemente cuando las medidas de expresión de ER y PR se llevan a cabo mediante el método dado a conocer por M. Elizabeth H *et al*, Journal of Clinical Oncology, 28 (16): 2784-2795 2010), y las células tumorales no se amplifican para el receptor de factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2 o ErbB2), un receptor situado normalmente en la superficie celular. Las células tumorales se consideran negativas para la expresión de ER y PR si menos del 5 por ciento de los núcleos de las células tumorales se tiñen para la expresión de ER y PR utilizando técnicas de inmunohistoquímica convencionales. Tal como se usa en el presente documento, las células tumorales se consideran negativas para la sobreexpresión de HER2 si producen una puntuación de resultado de prueba de 0 o 1 + o 2 + en las pruebas con un kit HercepTest™ (código K5204, Dako North America, Inc., Carpintería, CA), un ensayo inmunohistoquímico semicuantitativo que utiliza un anticuerpo primario policlonal anti-HER2 o si son negativas para HER2 FISH.

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

Tal como se usa en el presente documento, "agente inhibidor de c-MAF" se refiere a cualquier molécula capaz de inhibir total o parcialmente la expresión del gen c-MAF, tanto impidiendo que se produzca el producto de expresión de

dicho gen (interrumpiendo la transcripción del gen c-MAF y/o bloqueando la traducción del ARNm procedente de la expresión del gen c-MAF) como directamente inhibiendo la actividad de la proteína c-MAF. Inhibidores de la expresión del gen c-MAF pueden identificarse usando métodos basados en la capacidad del denominado inhibidor de bloquear la capacidad de c-MAF para promover la proliferación celular *in vitro*, tal como se muestra en la solicitud de patente internacional WO2005/046731, basados en la capacidad del denominado inhibidor de 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 de respuesta a c-MAF (MARE o elemento sensible a c-MAF) en células que expresan c-MAF tal y como se describe en el documento WO2008098351 o basados en la capacidad del denominado inhibidor de bloquear la expresión de un gen indicador bajo el control del promotor de IL-4 en respuesta a la estimulación con PMA/ionomicina en células que expresan NFATc2 y c-MAF tal y como se describe en el documento US2009048117A.

Tal como se usa en el presente documento, diana de la rapamicina en mamíferos (mTor) o "mTor" se refiere a aquellas proteínas que corresponden a EC 2.7.11.1. Las enzimas mTor son cinasas 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 capaz de inhibir total o parcialmente la expresión génica de mTor, tanto al impedir que se produzca el producto de expresión de dicho gen (interrumpiendo la transcripción génica de mTor y/o bloqueando la traducción del ARNm procedente de la expresión génica de mTor) como directamente inhibiendo la actividad proteica de mTor. Incluyendo inhibidores que tienen una diana doble o más dianas y entre ellos la actividad proteica de mTor.

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 en el desarrollo embrionario.

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento "resultado" o "resultado clínico" se refiere al curso que resulta de la enfermedad y/o de la progresión de la enfermedad y puede caracterizarse por ejemplo por recurrencia, el período de tiempo hasta la recurrencia, la metástasis, el período de tiempo hasta la metástasis, el número de metástasis, el número de sitios de metástasis y/o la muerte debida a la enfermedad. Por ejemplo, un buen resultado clínico incluye la cura, la prevención de la recurrencia, la prevención de la metástasis y/o la supervivencia en un plazo determinado de tiempo (sin recurrencia), y un mal resultado clínico incluye progresión de la enfermedad, metástasis y/o muerte dentro de un plazo fijo de tiempo.

Tal como se usa en el presente documento, se entiende por "cáncer de mama ER+" el cáncer de mama cuyas células tumorales expresan el receptor de estrógeno (ER). Esto hace a dichos tumores sensibles a estrógeno, lo cual significa que el estrógeno hace que el tumor de mama canceroso crezca. En contraste, "cáncer de mama ER-" se entiende como el cáncer de mama cuyas células tumorales no expresan el receptor de estrógeno (ER). Entre los cánceres de mama ER+ se incluyen subtipos luminal A y B.

Tal como se usa en el presente documento, el término "nivel de expresión" de un gen tal como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad medible de producto génico producido por el gen en una muestra del sujeto, en el que el producto génico puede ser un producto de la transcripción o un producto de la traducción. En consecuencia, el nivel de expresión puede corresponder a un producto génico de ácido nucleico tal como ARNm o ADNc o un producto génico de polipéptido. El nivel de expresión se deriva de la muestra de un sujeto y/o una muestra o muestras de referencia, y puede detectarse de novo o corresponder a una determinación anterior. El nivel de expresión puede determinarse o medirse, por ejemplo, utilizando métodos de microalineamientos, métodos de PCR (tales como qPCR), y/o métodos basados en anticuerpos, tal como conoce el experto en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "número de copias de gen" se refiere al número de copias de una molécula de ácido nucleico en una célula. El número de copias de un gen incluye el número de copias de gen en el ADN genómico (cromosómico) de una célula. En una célula normal (célula no tumoral), el número de copias de un gen normalmente es de dos copias (una copia en cada miembro de la pareja de cromosomas). El número de copias

de un gen incluye a veces la mitad del número de copias de gen procedente de muestras de una población de células.

“Nivel de expresión incrementado” se entiende como el nivel de expresión cuando se refiere a los niveles del gen c-MAF superiores a los que aparecen en una muestra de referencia o muestra de control. Estos niveles incrementados pueden provocarse sin que se excluyan otros mecanismos por una amplificación o translocación de un gen o locus cromosómicos 16q23 o 16q22-24. En particular, se puede considerar que una muestra presenta un nivel expresión de c-MAF alto cuando el nivel de expresión en la muestra aislada del paciente es de al menos aproximadamente 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a la referencia o control.

“Sonda”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de oligonucleótido que es complementaria a una secuencia específica de ácido nucleico 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 marcador específico. En algunas realizaciones, la etiqueta es un fluoróforo. En algunas realizaciones, la sonda es una sonda de hibridación *in situ* de ADN cuyo etiquetado se basa en la unión coordinativa estable del platino a ácidos nucleicos y proteínas. En algunas realizaciones, la sonda se describe en la solicitud de patente estadounidense 12/067532 y en la solicitud de patente estadounidense 12/181.399, o tal como se describe en Swennenhuis *et al.* “Construction of repeat-free fluorescence *in situ* hybridization probes” Nucleic Acids Research 40(3):e20 (2012).

“Etiqueta” o “marcador”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula física que esté directa o indirectamente asociada a una sonda, permitiendo visualizar, marcar o capturar de otro modo la sonda o la ubicación de la sonda.

“Translocación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al intercambio de material cromosómico en cantidades desiguales o iguales entre 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 frecuencia elevada en muchos tipos de cáncer, incluido cáncer de mama y leucemia. Las translocaciones pueden ser o bien translocaciones recíprocas primarias o bien las translocaciones secundarias más complejas. Hay varias translocaciones primarias que implican el locus de cadena pesada de inmunoglobina (IgH) que se cree que constituye 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 se asocia con una acumulación de expresión del gen de interés. En algunas realizaciones, la poliploidía se asocia con inestabilidad genómica. En algunas realizaciones, la inestabilidad genómica puede conducir a translocaciones cromosómicas.

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

“Secuenciación del exoma”, tal como se usa en el presente documento, es un proceso mediante el cual se secuencia toda la región codificante del ADN de un organismo. En la secuenciación del exoma, se secuencia el ARNm. Las regiones no traducidas del genoma no están incluidas 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.

Tal como se usa en el presente documento, se entiende por “metástasis” la propagación de un cáncer desde el órgano donde se inició hasta un órgano diferente. Ocurre generalmente a través de la sangre o el sistema linfático. Cuando las células cancerosas se diseminan y forman un tumor nuevo, éste se llama tumor secundario, o tumor metastásico. Las células cancerosas que forman el tumor secundario son como las del tumor original. Por ejemplo, si un cáncer de mama se disemina (metastatiza) al pulmón, el tumor secundario está formado por células malignas de cáncer de mama. La enfermedad en el pulmón es cáncer de mama metastásico y no cáncer de pulmón. En una realización particular del método de la invención, la metástasis es cáncer de mama triple negativo que se ha diseminado (metastizado) al hueso.

Tal como se usa en el presente documento, “predecir” se refiere a la determinación de la probabilidad de que el sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), o alternativamente, cáncer de mama ER+, desarrolle metástasis a un órgano distante. Tal como se usa en el presente documento, “buen pronóstico” indica que se espera (por ejemplo se predice) que el sujeto sobreviva y/o no tenga, o presente bajo riesgo de tener, recurrencia o metástasis distantes dentro de un período de tiempo determinado. El término “bajo” es un término relativo y, en el contexto de esta solicitud, se refiere al riesgo del grupo con “baja” expresión con respecto a un resultado clínico (recurrencia, metástasis distantes, etc.). Un “bajo” riesgo puede considerarse como un riesgo menor que el riesgo promedio de una población heterogénea de pacientes con cáncer. En el estudio de Paik *et al.* (2004), se consideró

que un riesgo “bajo” global de recurrencia era menor del 15 por ciento. El riesgo también variará en función del período de tiempo. El período de tiempo puede ser, por ejemplo, cinco años, diez años, quince años o incluso veinte años después del diagnóstico inicial del cáncer o después de que se hiciera el pronóstico.

5 Tal como se usa en el presente documento, “mal pronóstico” indica que se espera, por ejemplo, se predice que el sujeto no sobreviva y/o que presente, o tenga un alto riesgo de presentar, recurrencia o metástasis distante dentro de un período de tiempo determinado. El término “alto” es un término relativo y, en el contexto de esta solicitud, se refiere al riesgo del grupo con “alta” expresión con respecto a un resultado clínico (recurrencia, metástasis distantes, etc.). Un “alto” riesgo puede considerarse como un riesgo mayor que el riesgo promedio de una población heterogénea de
10 pacientes con cáncer. En el estudio de Paik *et al.* (2004), se consideró que un “alto” riesgo de recurrencia era superior al 15 por ciento. El riesgo también variará en función del período de tiempo. El período de tiempo puede ser, por ejemplo, cinco años, diez años, quince años o incluso veinte años después del diagnóstico inicial del cáncer o después de que se hiciera el pronóstico.

15 Tal como se usa en el presente documento, “valor de referencia”, se refiere a un valor de laboratorio usado como referencia para valores/datos obtenidos mediante exámenes de laboratorio de los pacientes o muestras recogidas de pacientes. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior y/o inferior, un intervalo de valores, un valor promedio, un valor mediana, un valor medio, o un valor en comparación con un control particular o valor inicial. Un valor de referencia puede estar basado en un valor de
20 muestra individual, tal como por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que está sometándose a prueba, pero en un momento anterior. El valor de referencia puede estar basado en un gran número de muestras, tal como de una población de sujetos del mismo grupo de edad, o puede estar basado en un conjunto de muestras, incluyendo o excluyendo la muestra que va a someterse a ensayo.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “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 ser humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

30 El término “tratamiento”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de terapia, que tenga como objetivo la terminación, la prevención, la mejora o la reducción de 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. Así, “tratamiento”, “tratar” y sus términos equivalentes se refieren a la obtención
35 de un efecto farmacológico o fisiológico deseado, que cubre cualquier tratamiento de un estado patológico o trastorno en un mamífero, incluyendo un ser humano. El efecto puede ser profiláctico en cuanto a prevenir total o parcialmente un trastorno o síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en cuanto a una cura parcial o completa para un trastorno y/o efecto adverso atribuible al trastorno. Es decir, “tratamiento” incluye (1) prevenir que el trastorno se produzca o se repita en un sujeto, (2) inhibir el trastorno, tal como deteniendo su desarrollo, (3) detener o terminar el desorden o por lo menos los síntomas asociados al mismo, de modo que el huésped ya no padece el trastorno o sus síntomas, tal como provocando la regresión del trastorno o sus síntomas, por ejemplo, mediante la restauración o reparación de una función perdida, ausente o defectuosa, o estimulando un proceso ineficiente, o (4), aminorando, aliviando o mejorando el trastorno, o los síntomas asociados al mismo, donde aminorar se utiliza en un sentido amplio para referirse a, al menos, una reducción en la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor o deficiencia
40 inmunitaria.
45

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 c-MAF. La muestra puede aislarse de cualquier tejido biológico adecuado o líquido, tales como, por
50 ejemplo, tejido tumoral, sangre, plasma sanguíneo, suero, orina o líquido cefalorraquídeo (CSF).

“Muestra de tejido tumoral” se entiende como la muestra de tejido procedente del tumor primario de cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), o alternativamente de un tumor de cáncer de mama ER+. Dicha muestra se puede obtener mediante métodos convencionales, por ejemplo, biopsia, utilizando métodos bien conocidos por los
55 expertos en las técnicas médicas relacionadas.

“Metástasis ósea osteolítica” se refiere a un tipo de metástasis en la que se produce resorción ósea (pérdida progresiva de la densidad ósea) en la proximidad de la metástasis resultante de la estimulación de la actividad de los osteoclastos por las células tumorales y caracterizada por dolor severo, fracturas patológicas, hipercalcemia, compresión de la médula espinal y otros síndromes resultantes de la compresión de los nervios.
60

Método para la predicción de metástasis ósea de un cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), basándose en el nivel de expresión de c-MAF

65 Sorprendentemente, se encontró que el nivel de expresión de c-MAF en muestras de un cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), y en muestras de cáncer de mama ER+, se correlacionaba con el riesgo de

padecer metástasis ósea. Además, la expresión del gen c-MAF en tumores primarios triple negativos (incluyendo de tipo basal), y en tumores primarios ER+, se correlacionaba significativamente con la recurrencia de metástasis ósea, e inversamente con la supervivencia y supervivencia libre de metástasis ósea. Además, se ha encontrado que los niveles de expresión de c-MAF predicen metástasis ósea en una forma dependiente de la dosis.

5 En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* (en lo sucesivo primer método de la invención) para predecir las metástasis óseas de un cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) en un sujeto que padece dicho cáncer, que comprende

10 i) determinar el nivel de expresión, o amplificación del gen c-MAF en una muestra de dicho sujeto y
ii) comparar el nivel de expresión, o la amplificación obtenido en la etapa i) con un valor de referencia, o la amplificación obtenida en la etapa i) con un número de copias de gen de referencia,

15 en donde un nivel de expresión incrementado de dicho gen con respecto a dicho valor de referencia o amplificación incrementada de dicho gen con respecto a un número de copias de gen de referencia es indicativa de un riesgo incrementado de desarrollar metástasis ósea.

20 El método de la invención comprende en una primera etapa determinar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de un sujeto. En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

25 Los métodos para obtener una muestra de la biopsia incluyen dividir un tumor en trozos grandes, o microdissección u otros métodos de separación de células conocidos en la técnica. Las células tumorales se pueden obtener de forma adicional mediante citología por aspiración con una aguja fina. Para simplificar la conservación y el manejo de las muestras, las muestras se pueden fijar en formalina y embeberse en parafina o congelarse en primer lugar y después embeberse en un medio de congelación de tejido, tal como compuesto OCT, mediante inmersión en un medio altamente criogénico que permite la congelación rápida.

30 En una realización preferida, el primer método de la invención comprende cuantificar sólo el nivel de expresión génica de c-MAF como un único marcador, es decir, el método no implica la determinación del nivel de expresión de ningún marcador adicional.

35 Tal como entiende el experto en la técnica, la cuantificación del nivel de expresión génica se puede determinar midiendo los niveles del ARN mensajero de dicho gen o de la proteína codificada por dicho gen, así como el número de copias de región genómica o translocaciones que contienen dicho gen.

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

45 Así, la cuantificación del nivel de expresión del gen c-MAF puede realizarse a partir del ARN resultante de la transcripción de dicho gen (ARN mensajero o ARNm) o, alternativamente, a partir del ADN complementario (ADNc) de dicho gen. Por tanto, en una realización particular de la invención, la cuantificación de los niveles de expresión del gen c-MAF comprende la cuantificación del ARN mensajero del gen c-MAF, o un fragmento de dicho ARNm, ADN complementario del gen c-MAF, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.

50 Prácticamente cualquier método convencional puede usarse dentro del alcance de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm codificados por el gen c-MAF o de su ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm codificados por dicho gen pueden cuantificarse usando métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante transferencia de tipo Southern y usando sondas apropiadas, transferencia de tipo Northern y usando sondas específicas del ARNm del gen de interés (c-MAF)
55 o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-LCR, hibridación, microalineamientos, etc., preferentemente, mediante PCR cuantitativa a tiempo real usando un marcador apropiado. Análogamente, los niveles del ADNc correspondientes a dicho ARNm codificado por el gen c-MAF también pueden cuantificarse mediante el uso de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente ADNc mediante transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho ADNc. Pueden encontrarse métodos convencionales para cuantificar el nivel de expresión, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001. (citado anteriormente). Estos métodos son conocidos y un experto en la técnica estaría familiarizado con las normalizaciones necesarias para cada técnica. Por ejemplo, las medidas de expresión generadas utilizando la PCR multiplex deben normalizarse mediante la comparación de la expresión de los genes que se miden con los llamados genes "constitutivos", cuya expresión debe ser constante en todas las muestras,
60 proporcionando así una expresión basal para comparar contra o con otros genes control cuya expresión se sabe que se modula con el cáncer.
65

En una realización particular, la cuantificación del nivel de expresión del gen c-MAF se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o un alineamiento de ADN o ARN o mediante técnicas de hibridación de nucleótidos.

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

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

Las variantes según la invención tienen preferentemente 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 proteína c-MAF definidas anteriormente se determina usando algoritmos y procedimientos informáticos que son ampliamente conocidos para los expertos en la técnica. La similitud entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP [BLAST Manual, Altschul, S., *et al*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

El nivel de expresión de la proteína c-MAF puede cuantificarse mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, dichos niveles de dicha proteína pueden cuantificarse, por ejemplo, usando anticuerpos con capacidad de unirse a c-MAF (o a fragmentos de la misma que contenga un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos usados en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que pueden usarse incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); estas técnicas incluyen inmunotransferencia de tipo Western o transferencia de tipo Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA de tipo sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microalineamientos de proteínas que incluyen anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas. Otras maneras para detectar y cuantificar dicha proteína c-MAF incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc. Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe que se une a la proteína c-MAF con alta afinidad para detectar la cantidad de la misma. Sin embargo, se prefiere el uso de un anticuerpo, por ejemplo, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos humanizados, nanocuerpos, alfacuerpos, péptidos grapados, ciclopéptidos y anticuerpos. En el mercado existen anticuerpos comerciales contra la proteína c-MAF que pueden usarse en el contexto de la presente invención, tales como, por ejemplo, los anticuerpos ab427, ab55502, ab55502, ab72584, ab76817, ab77071 (Abcam plc, 330 Science Park, Cambridge CB4 0FL, Reino Unido), el anticuerpo monoclonal O75444 (anticuerpo monoclonal libre de azida anti-MAF humana de ratón, no conjugado, clon 6b8) de AbD Serotec, etc. Son múltiples las casas comerciales que ofrecen anticuerpos anti-c-MAF, tales como Abnova Corporation, Bethyl Laboratories, Santa Cruz Biotechnology, Bioworld Technology, GeneTex, etc.

En una realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína c-MAF se realiza mediante inmunotransferencia de tipo Western, ELISA o un alineamiento de proteínas.

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

El primer método de la invención comprende, en una segunda etapa, comparar el nivel de expresión del gen c-MAF obtenido en la muestra (por ejemplo, muestra tumoral) del sujeto con un valor de referencia.

Una vez medidos los niveles de expresión del gen c-MAF en una muestra de un sujeto con cáncer de mama, por ejemplo, cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) o, alternativamente, cáncer de mama ER+, y comparados con el valor de referencia, si los niveles de expresión de dicho gen están incrementados respecto a dicho valor de referencia, entonces se puede concluir que dicho sujeto presenta una mayor propensión a desarrollar una metástasis ósea.

La determinación de los niveles de expresión del gen c-MAF debe correlacionarse con el valor de referencia.

En una realización, el valor o valores de referencia tal como se entiende en el presente documento pueden representar cantidades absolutas de c-MAF. En otra realización, la cantidad de uno 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 a aumento o disminución, o aumento o disminución de número de veces). Ventajosamente, esto puede permitir comparar la cantidad de uno o más biomarcadores en la muestra del sujeto con el valor de referencia (en otras palabras, medir la cantidad relativa de uno cualquiera o más biomarcadores en la muestra del sujeto vis-a-vis el valor de referencia) sin necesidad de determinar primero las cantidades absolutas respectivas de dichos uno o más biomarcadores.

En una realización preferida, el valor de referencia es el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de control o muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor a analizar, la naturaleza exacta del control o muestra de referencia puede variar. Así, en el caso de que se vaya a evaluar un pronóstico, entonces la muestra de referencia es una muestra de un sujeto con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) o, alternativamente, cáncer de mama ER+, que no experimentado metástasis o que se corresponde con el valor de la mediana del nivel de expresión génica de c-MAF medida en una colección de tejido tumoral de muestras de biopsia de pacientes con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) o, alternativamente, cáncer de mama ER+, 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 se encuentra bien caracterizada. En tales muestras, las concentraciones normales (concentración de referencia) del biomarcador (gen c-MAF) se pueden determinar, por ejemplo, proporcionando la concentración media sobre la población de referencia. Al determinar la concentración de referencia del marcador se tienen en cuenta varias consideraciones. Entre tales consideraciones están la edad, peso, sexo, estado físico general del paciente y similares. Por ejemplo, se toman como grupo de referencia cantidades iguales de un grupo de al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 100 a preferiblemente más de aproximadamente 1000 sujetos, preferiblemente clasificados según las consideraciones anteriores, por ejemplo, según diversas categorías de edad. La colección de muestras de las que deriva el nivel de referencia estará preferiblemente constituida por sujetos que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente objeto de estudio.

En una realización particular, los valores de referencia para expresión "incrementada" o "disminuida" de la expresión de c-MAF se determinan calculando los percentiles por medios convencionales, lo que implica realizar ensayos en una o varias muestras aisladas de sujetos en los que la enfermedad se encuentra bien documentada por alguno de los métodos mencionados anteriormente de los niveles de expresión de c-MAF. Los niveles "reducidos" de c-MAF se pueden entonces asignar, preferiblemente, a muestras en donde los niveles de expresión de c-MAF son iguales a o inferiores al percentil 50 en la población normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de expresión iguales a o inferiores al percentil 60 en la población normal, iguales a o inferiores al percentil 70 en la población normal, iguales a o inferiores al percentil 80 en la población normal, iguales a o inferiores al percentil 90 en la población normal, e iguales a o inferiores al percentil 95 en la población normal. Los niveles de expresión "incrementados" del gen c-MAF se pueden entonces asignar, preferiblemente, a muestras en donde los niveles de expresión del gen c-MAF son iguales a o superan el percentil 50 en la población normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de expresión iguales a o en exceso al percentil 60 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 70 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 80 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 90 en la población normal, e iguales a o en exceso al percentil 95 en la población normal.

al percentil 80 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 90 en la población normal, e iguales a o en exceso al percentil 95 en la población normal.

Un experto en la técnica comprenderá que la predicción de la tendencia de un tumor primario de mama a metastatizar no necesita ser correcta para todos los sujetos que van a identificarse (es decir, 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 cohorte). Si una parte es estadísticamente significativa se puede determinar de una manera sencilla por el experto en la técnica utilizando diferentes herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de los intervalos de confianza, la determinación de los valores de p, ensayo T de Student, Mann-Whitney, etc. Se proporcionan detalles en Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley and Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos del 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 y 0,0001. Más preferiblemente, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% de los sujetos de una población pueden identificarse adecuadamente por el método de la presente invención.

En aún otra realización, la metástasis ósea es una metástasis ósea osteolítica.

En aún otra realización, un nivel de expresión de c-MAF que está por encima del promedio indica un mayor riesgo de metástasis ósea, siendo dicho riesgo proporcional a los niveles de expresión de c-MAF. Por lo tanto, el riesgo de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de mama es dependiente de la dosis.

Método para predecir el resultado clínico de un paciente que padece metástasis ósea de cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) o, alternativamente de cáncer de mama ER+, basándose en el nivel de expresión de c-MAF (que no forma parte de la invención)

En otra divulgación, el documento se refiere a un método *in vitro* (a continuación en el presente documento segundo método de la invención) para predecir el resultado clínico de un paciente que padece metástasis ósea de cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) o, alternativamente metástasis ósea de cáncer de mama ER+, que comprende:

- i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-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 donde un nivel de expresión incrementado de dicho gen con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de un mal resultado clínico.

El presente método de la divulgación comprende, en una primera etapa, cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) o, alternativamente, cáncer de mama ER+. En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

En una realización preferida, el presente método de la divulgación comprende cuantificar solo el nivel de expresión del gen c-MAF como un único marcador, es decir, el método no implica la determinación del nivel de expresión de ningún marcador adicional.

En una segunda etapa, el nivel de expresión del gen c-MAF obtenido de la muestra del tumor del sujeto se compara con un valor de referencia. En una realización preferida, 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 c-MAF debe estar correlacionada con los valores de una muestra de control o muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor a analizar, la naturaleza exacta de la muestra de control puede variar. Por tanto, en el caso que implica el presente método del documento, entonces la muestra de referencia es una muestra de sujeto con cáncer de mama que no ha padecido metástasis ósea o que corresponde al valor de la mediana del nivel de expresión del gen c-MAF medido en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de mama que no han padecido metástasis.

Una vez que el nivel de expresión del gen c-MAF en la muestra se mide y se compara con la muestra de control, si el nivel de expresión de dicho gen está incrementado con respecto a su nivel de expresión en la muestra de control, entonces es indicativo de un mal resultado clínico.

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

En otra divulgación específica, la cuantificación del nivel de expresión del gen c-MAF comprende 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. En una realización más preferida, el nivel de expresión se cuantifica por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o un alineamiento de ADN o ARN.

En otra divulgación, la cuantificación del nivel expresión del gen c-MAF comprende cuantificar el nivel de proteína

codificada por dicho gen o de una variante de la misma. En una realización aún más preferida, el nivel de proteína se determina por medio de inmunotransferencia de tipo Western, inmunohistoquímica, ELISA o un alineamiento de proteínas.

- 5 En otra divulgación, la muestra de referencia es una muestra de tejido tumoral de un cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) o, alternativamente cáncer de mama ER+, de un sujeto que no ha padecido metástasis.

Cualquier parámetro que es ampliamente aceptado para determinar los resultados clínicos de un paciente puede usarse en el presente documento incluyendo, sin limitación:

- 10 • 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 recurrencia de la enfermedad durante el período de tiempo bajo estudio.

- 15 • supervivencia libre de enfermedad (DFS), tal como se usa en el presente documento, se entiende como el período de tiempo después del tratamiento para una enfermedad durante el cual un sujeto sobrevive sin signos de la enfermedad.

- 20 • respuesta objetiva que, tal como se utiliza en la presente invención, describe la proporción de los sujetos tratados en los cuales se observa una respuesta completa o parcial.

- control del tumor que, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la proporción de los sujetos tratados en los cuales se observa una respuesta completa, respuesta parcial, respuesta mínima o enfermedad estable durante ≥ 6 meses.

- 25 • supervivencia libre de progresión que, tal como se usa en el presente documento, se define como el tiempo desde el comienzo del tratamiento hasta la primera medición del crecimiento del cáncer.

- 30 • Tiempo hasta la progresión (TTP), tal como se usa en el presente documento, se refiere al tiempo después de que una enfermedad se trate hasta que la enfermedad comienza a empeorar. El término "progresión" se ha definido previamente.

- supervivencia libre de progresión a los seis meses o tasa "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

- 35 • mediana de supervivencia que, tal como se usa en el presente documento, se refiere al momento en que la mitad de los sujetos incluidos en el estudio aún están vivos.

- 40 Los términos "bueno" y "malo", tal y como se usan en el presente documento para referirse a un resultado clínico significan que el sujeto mostrará un resultado favorable o desfavorable. Tal como un experto en la técnica comprenderá, se da a conocer que tal evaluación de la probabilidad, aunque se prefiere, puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que van a diagnosticarse. No obstante, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos pueda identificarse como que tiene una predisposición a un resultado dado. Si una parte es estadísticamente significativa se puede determinar de una manera sencilla por el experto en la técnica utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de los intervalos de confianza, la determinación de los valores de p, prueba de la T de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Se encuentran detalles en Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley and 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%, al menos aproximadamente el 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 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 apropiadamente por el método del presente documento.

- 55 Método para el diseño de una terapia personalizada en pacientes con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) o firma sensible a SRC+ o tumores de mama HER2+

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

- 65 Por lo tanto, según se describe en la presente invención, sabiendo que la sobreexpresión del gen c-MAF en células de cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) está relacionada con la presencia de metástasis, entonces, el nivel de expresión del gen c-MAF es útil para tomar decisiones en cuanto a la terapia más adecuada para el sujeto que padece dicho cáncer.

Así, en otro aspecto la invención se refiere a un método *in vitro* (a partir de ahora tercer método de la invención) para diseñar una terapia personalizada para un sujeto afectado de cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) que comprende

i) cuantificar el nivel de expresión o amplificación del gen c-MAF en una muestra de dicho sujeto y

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

en el que, si el nivel de expresión está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, o la amplificación es amplificación incrementada con respecto a dicho número de copias de gen de referencia, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia para prevenir y/o tratar la metástasis ósea. Si el nivel de expresión no está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, o la amplificación no está incrementada con respecto a dicho número de copias de gen de referencia, entonces dicho sujeto no es susceptible de recibir una terapia para prevenir y/o tratar la metástasis ósea.

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

El segundo método de la invención comprende en una primera etapa cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra en un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal). En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

En otra realización particular, el presente método de la invención comprende cuantificar solamente el nivel de expresión del gen c-MAF como marcador simple, es decir, el método no implica determinar el nivel de expresión de cualquier marcador adicional.

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

En una segunda etapa, se compara el nivel de expresión del gen c-MAF obtenido en la muestra tumoral del sujeto con un valor de referencia. En una realización preferida, el valor de referencia es el nivel de expresión del gen c-MAF de dicho gen en una muestra de control. La determinación del nivel de expresión del gen c-MAF debe estar relacionada con los valores de una muestra de control o muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor a analizar, la naturaleza exacta de la muestra de control puede variar. Así, preferiblemente la muestra de referencia es una muestra de un sujeto con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) que no ha experimentado metástasis o que corresponde al valor de la mediana del nivel de expresión del gen c-MAF medido en una colección de tejidos de tumor en muestras de biopsias de sujetos con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) que no han experimentado metástasis.

Una vez que el nivel de expresión del gen c-MAF en la muestra se ha medido y comparado con el valor de referencia, si el nivel de expresión de dicho gen está incrementado con respecto al valor de referencia, entonces se puede concluir que dicho sujeto es susceptible de recibir la terapia para prevenir (si el sujeto tiene todavía que experimentar metástasis) y/o tratar la metástasis (si el sujeto ya ha experimentado la metástasis).

Cuando el cáncer ha experimentado metástasis, pueden usarse tratamientos sistémicos entre los que se incluyen, sin limitarse a, quimioterapia, tratamiento hormonal, inmunoterapia, o una combinación de éstos. Adicionalmente, puede emplearse radioterapia y/o cirugía. La elección del tratamiento depende generalmente del tipo de cáncer primario, del tamaño, la ubicación de la metástasis, la edad, la salud general del paciente y los tipos de tratamientos usados previamente.

Los tratamientos sistémicos son aquellos que llegan a todo el cuerpo, tales como:

- La quimioterapia es el uso de medicamentos para destruir las células cancerosas. Por lo general, los medicamentos se administran por vía oral o intravenosa. Algunas veces, se usa quimioterapia junto con tratamiento de radiación. Los tratamientos quimioterapéuticos adecuados para el cáncer de mama incluyen, sin limitarse, antraciclinas (doxorubicina, epirubicina, doxorubicina liposomal pegilada), taxanos (paclitaxel, docetaxel, paclitaxel, paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina), 5-fluorouracilo (infusión continua 5-FU, 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 propio sistema inmunitario del paciente a combatir el cáncer. Hay varios tipos de inmunoterapia que se utilizan para tratar la metástasis en pacientes. Estos incluyen, pero no se limitan a, citocinas, anticuerpos monoclonales y vacunas antitumorales.

En otro aspecto, el tratamiento es Alpharadin (dicloruro de radio-223). La Alpharadin usa radiación alfa de la desintegración del radio-223 para matar las células cancerosas. El radio-223 se autodirige de manera natural a metástasis óseas en virtud de sus propiedades como imitador de calcio. La radiación alfa tiene un alcance muy corto de 2-10 células (en comparación con la radioterapia actual que se basa en la radiación beta o gamma) y, por lo tanto, provoca menos daño a los tejidos sanos circundantes (particularmente la médula ósea). Con propiedades similares al calcio, el radio-223 es atraído a lugares donde el calcio se usa para construir hueso en el cuerpo, incluyendo el sitio de crecimiento óseo más rápido y anómalo, tal como el observado en las 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 a sitios de crecimiento óseo anómalo. El lugar donde comienza un cáncer en el cuerpo se conoce como tumor primario. Algunas de estas células pueden separarse y transportarse en el torrente sanguíneo a otra parte del cuerpo. Las células cancerosas pueden entonces asentarse 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 tardío padecen la carga máxima de la enfermedad en sus huesos. El objetivo con el radio-223 es atacar selectivamente este cáncer secundario. Cualquier radio-223 no absorbido en los huesos se dirige rápidamente al intestino y se excreta.

En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de mTor. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor es un inhibidor doble de mTor/PI3cinasa. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para prevenir o inhibir la metástasis. 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 liberadora de sirolimús biomanipulado Combo ORBUSNEICH (sirolimús), Curaxin CBL102 (mepacrina), DE109 (sirolimús), DS3078, Endeavor 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 (everolimús), Taltorvic (ridaforolimús), Tarceva (erlotinib), Torisel (temsirolimús), Xience Prime (everolimús), Xience V (everolimús), Zomaxx (zotarolimús), Zortress (everolimús), endoprótesis periférica liberadora de zotarolimús MEDTRONIC(zotarolimús), AP23841, AP24170, ARmTOR26, BN107, BN108, Canstatina GENZYME (canstatina), CU906, EC0371, EC0565, K11004, LOR220, NV128, Rapamicina ONCOIMMUNE (sirolimús), SB2602, Sirolimus PNP SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS (sirolimús), TOP216, VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, Advacan (everolimús), AZD8055, endoprótesis coronaria liberadora de sirolimús Cypher Select Plus (sirolimús), endoprótesis coronaria liberadora de sirolimús Cypher (sirolimús), globo revestido de fármaco (sirolimús), E-Magic Plus (sirolimús), Emtor (sirolimús), Esprit (everolimús), Evertor (everolimús), HBF0079, LCP-Siro (sirolimús), Limus CLARIS (sirolimús), inhibidor de mTor CELLZOME, endoprótesis coronaria liberadora de sirolimús Nevo (sirolimús), nPT-mTor, Rapacan (sirolimús), Renacept (sirolimús), ReZolve (sirolimús), Rocas (sirolimús), SF1126, Sirolim (sirolimús), Sirolimus NORTH CHINA (sirolimús), Sirolimus RANBAXY (sirolimús), Sirolimus WATSON (sirolimús), Siropam (sirolimús), Sirova (sirolimús), Supralimus (sirolimús), Supralimus-Core (sirolimús), Tacrolimus WATSON (tacrolimús), TAFA93, Temsirolimus ACCORD (temsirolimús), Temsirolimus 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; visitado por última vez el 28/11/2012). En otro aspecto, se combina everolimus 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 of inhibidor de mTors. 2010. Anticancer Agents Med. Chem. 10(7): 571-81). En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para tratar o prevenir o inhibir 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 divulgaciones, el paciente es ER+. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para tratar o prevenir o inhibir 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 Src cinasa. En algunos aspectos, el inhibidor de Src se usa para prevenir o inhibir metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de Src cinasa se selecciona del grupo: AZD0530 (saracatinib), Bosulif (bosutinib), ENMD981693, KD020, KX01, Sprycel (dasatinib), Yervoy (ipilimumab), AP23464, AP23485, AP23588, AZD0424, inhibidor de c-Src cinasa KISSEI, CU201, KX2361, SKS927, SRN004, SUNK706, TG100435, TG100948, AP23451, Dasatinib HETERO (dasatinib), Dasatinib VALEANT (dasatinib), Fontrax (dasatinib), inhibidor de Src cinasa KINEX, VX680, (lactato de tozasertib), XL228 y SUNK706. En algunas realizaciones, el inhibidor de Src cinasa es dasatinib. En otro aspecto, pueden identificarse inhibidores de Src cinasa a través de los métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sen, B. y Johnson, F.M. Regulation of Src Family Kinases in

Human Cancers. 2011. J. Signal Transduction. 2011: 14 páginas). En algunos aspectos, el inhibidor de Src cinasa se usa para tratar o prevenir o inhibir metástasis en un paciente que es positivo para la firma sensible a SRC (SRS). En algunos aspectos, el paciente es SRS+ y ER-. (Véase, por ejemplo, Zhang, CH. -F, *et al.* Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent survival signals. 2009. Cancer Cell. 16:67-78). En algunos aspectos, el Inhibidor de Src cinasa se usa para tratar o prevenir o inhibir metástasis en un paciente con cáncer de mama avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de Src cinasa se usa en combinación con un segundo tratamiento. En algunos aspectos, el segundo tratamiento es cualquier tratamiento descrito en el presente documento.

En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de COX-2. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se usa para prevenir o inhibir metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se selecciona del grupo: ABT963, Acetaminofeno ER JOHNSON (acetaminofeno), Acular X (ketorolaco trometamina), BAY1019036 (aspirina), BAY987111 (difenhidramina, naproxeno sódico), BAY11902 (piroxicam), BCIBUCH001 (ibuprofeno), Capoxigem (apricoxib), CS502, CS670 (pelubuprofeno), Diclofenac HPBCD (diclofenaco), Diractin (ketoprofeno), GW406381, HCT1026 (nitroflurbiprofeno), Hyanalgese-D (diclofenaco), HydrocoDex (acetaminofeno, dextrometorfono, hidrocodona), ibuprofeno sódico PFIZER (ibuprofeno sódico), ibuprofeno con acetaminofeno PFIZER (acetaminofeno, ibuprofeno), Impracor (ketoprofeno), IP880 (diclofenaco), IP940 (indometacina), ISV205 (diclofenaco sódico), JNS013 (acetaminofeno, clorhidrato de tramadol), ketoprofeno TDS (ketoprofeno), LTNS001 (naproxeno etemesil), mesalamina SALIX (mesalamina), mesalamina SOFAR (mesalamina), mesalazina (mesalamina), ML3000 (licofelona), MRX7EAT (etodolaco), naproxeno IROKO (naproxeno), NCX4016 (nitroaspirina), NCX701 (nitroacetaminofeno), Nuprin SCOLR (ibuprofeno), OMS103HP (clorhidrato de amitriptilina, ketoprofeno, clorhidrato de oximetazolina), Oralease (diclofenaco), OxycoDex (dextrometorfono, oxycodona), P54, PercoDex (acetaminofeno, dextrometorfono, oxycodona), PL3100 (naproxeno, fosfatidil colina), PSD508, R-ketoprofeno (ketoprofeno), Remura (bromfenaco sódico), ROX828 (ketorolaco trometamina), RP19583 (ketoprofeno lisina), RQ00317076, SDX101 (R-etodolaco), TDS943 (diclofenaco sódico), TDT070 (ketoprofeno), TPR100, TQ1011 (ketoprofeno), TT063 (S-flurbiprofeno), UR8880 (cimicoxib), V0498TA01A (ibuprofeno), VT122 (etodolaco, propranolol), XP20B (acetaminofeno, dextropropoxifeno), XP21B (diclofenaco potásico), XP21L (diclofenaco potásico), Zoenasa (acetilcisteina, mesalamina), Acephen, Actifed Plus, Actifed-P, Acular, Acular LS, Acular PF, Acular X, Acuvail, Advil, Advil Allergy Sinus, Advil Cold and Sinus, Advil Congestion Relief, Advil PM, Advil PM Capsule, Air Salonpas, Airtal, Alcohol-Free NyQuil Cold & Flu Relief, Aleve, Aleve ABDI IBRAHIM, Aleve-D, Alka-Seltzer, Alka-Seltzer BAYER, Alka-Seltzer Extra Strength, Alka-Seltzer Lemon-Lime, Alka-Seltzer Original, Alka-Seltzer Plus, Alka-Seltzer plus Cold and Cough, Alka-Seltzer plus Cold and Cough Formula, Alka-Seltzer Plus Day and Night Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Day Non-Drowsy Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Flu Formula, Alka-Seltzer Plus Night Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Sinus Formula, Alka-Seltzer Plus Sparkling Original Cold Formula, Alka-Seltzer PM, Alka-Seltzer Wake-Up Call, Anacin, Anaprox, Anaprox MINERVA, Ansaid, Apitoxina, Apranax, Apranax abdi, Arcoxia, Bengay Fórmula para artritis, Arthrolex, Asacol, Asacol HD, Asacol MEDUNA ARZNEIMITTEL, Asacol ORIFARM, Aspirina BAYER, Aspirina Complex, Aspirina Migran, AZD3582, Azulfidine, Baralgan M, BAY1019036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001, Benadryl Allergy, Benadryl Day and Night, Benylin 4 Flu, Benylin Cold and Flu, Benylin Cold and Flu Day and Night, Benylin Cold and Sinus Day and Night, Benylin Cold and Sinus Plus, Benylin Day and Night Cold and Flu Relief, Benylin1 All-In-One, Brexin, Brexin ANGELINI, Bromday, Bufferin, Buscopan Plus, Caldolor, Calmatel, Cambia, Canasa, Capoxigem, Cataflam, Celebrex, Celebrex ORIFARM, Advil Allergy Sinus Infantil, Tylenol Infantil, Tylenol Cough and Runny Nose Infantil, Tylenol plus cold Infantil, Tylenol plus Cold and Cough Infantil, Tylenol plus cold and stuffy nose Infantil, Tylenol plus Flu Infantil, Tylenol plus cold & allergy Infantil, Tylenol plus Cough & Runny Nose Infantil, Tylenol plus Cough & Sore Throat Infantil, Tylenol plus multi symptom cold Infantil, Clinoril, Codral Cold and Flu, Codral Day and Night Day en comprimidos, Codral Day and Night Night en comprimidos, Codral Nighttime, Colazal, Combunox, Contac Cold plus Flu, Contac Cold plus Flu Non-Drowsy, Coricidin D, Coricidin HBP Cold and Flu, Coricidin HBP Day and Night Multi-Symptom Cold, Coricidin HBP Maximum Strength Flu, Coricidin HBP Nighttime Multi-Symptom Cold, Coricidin II Extra Strength Cold and Flu, CS502, CS670, Daypro, Daypro Alta, DDS06C, Demazin Cold and Flu, Demazin Cough, Cold and Flu, Demazin day/night Cold and Flu, Demazin PE Cold and Flu, Demazin PE day/night Cold and Flu, 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 Vitamina C, Efferalgan Vitamina C, Elixsure IB, Excedrin Back and Body, Excedrin Migraine, Excedrin PM, Excedrin Sinus Headache, Excedrin Tension Headache, Falcol, Fansamac, Feldene, FeverAll, Fiorinal, Fiorinal con codeína, Flanax, Flector Patch, Flucam, Fortagesic, Gerbin, Giazio, Gladio, Goody's Back and Body Pain, Goody's Cool Orange, Goody's Extra Strength, Goody's PM, Greaseless Bengay, GW406381, HCT1026, He Xing Yi, Hyanalgese-D, HydrocoDex, Ibuprofeno sódico PFIZER, Ibuprofeno con, Acetaminofeno PFIZER, Icy Hot SANOFI AVENTIS, Impracor, Indocin, Indometacina APP PHARMA, Indometacina MYLAN, Tylenol infantil, 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, Lofit 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, Norgesc 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, Pedea, 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, Salompas, Saridon, SDX101, Seltouch, sfRowasa, Shinbaro, Sinumax, Sinutab, Sinutab, sinus, Spalt, Sprix, Strefen, Sudafed Cold and Cough, Sudafed Head Cold and Sinus, Sudafed PE Cold plus Cough, Sudafed PE Pressure plus Pain, Sudafed PE, Severe Cold, Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Day en comprimidos, Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Night en comprimidos, Sudafed PE Sinus plus Anti-inflammatory Pain Relief, Sudafed Sinus Advance, Surgam, Synalgos-DC, Synflex, Tavist allergy/sinus/headache, TDS943, TDT070, Theraflu Cold and Sore Throat, Theraflu Daytime Severe Cold and Cough, Theraflu Daytime Warming Relief, Theraflu Warming Relief Caplets Daytime Multi-Symptom Cold, Theraflu Warming Relief Cold and Chest Congestion, Thomapyrin, Thomapyrin C, Thomapyrin efervescente, Thomapyrin Medium, Tilcotil, Tispol, Tolectin, Toradol, TPR100, TQ1011, Trauma-Salbe, Trauma-Salbe Kwizda, Treo, Treximet, Trovex, TT063, Tylenol, Tylenol Allergy Multi-Symptom, Tylenol Back Pain, Tylenol Cold & Cough Daytime, Tylenol Cold & Cough Nighttime, Tylenol Cold and Sinus Daytime, Tylenol Cold and Sinus Nighttime, Tylenol Cold Head Congestion Severe, Tylenol Cold Multi Symptom Daytime, Tylenol Cold Multi Symptom Nighttime Liquid, Tylenol Cold Multi Symptom Severe, Tylenol Cold Non-Drowsiness Formula, Tylenol Cold Severe Congestion Daytime, Tylenol Complete Cold, Cough and Flu Night time, Tylenol Flu Nighttime, Tylenol Menstrual, Tylenol PM, Tylenol Sinus Congestion & Pain Daytime, Tylenol Sinus Congestion & Pain Nighttime, Tylenol Sinus Congestion & Pain Severe, Tylenol Sinus Severe Congestion Daytime, Tylenol Ultra Relief, Tylenol con cafeína y fosfato de codeína, Tylenol con fosfato de codeína, Ultra Strength Bengay Cream, Ultracet, UR8880, V0498TA01A, Vicks NyQuil Cold and Flu Relief, Vicoprofen, Vimovo, Voltaren Emulgel, Voltaren GEL, Voltaren NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH, Voltaren XR, VT122, Xefo, Xefo Rapid, Xefocam, Xibrom, XL3, Xodol, XP20B, XP21B, XP21L, Zipsor y Zoenasa. En otro aspecto, pueden identificarse inhibidores de 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: 109-1 26). En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se usa para tratar o prevenir o inhibir metástasis en un paciente con cáncer de mama avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se usa en combinación con un segundo tratamiento. En algunos aspectos, el segundo tratamiento es cualquier tratamiento descrito en el presente documento. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se usa en combinación con un segundo tratamiento seleccionado del grupo que consiste en: Denosumab, Zometa (http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&Novald=2935376934467633633; visitado por última vez el 2/12/2012), Carbozantinib o Caboazantinib, anticuerpo o péptido que bloquea la PTHLH (hormona similar a la hormona paratiroidea) o PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea) y Everolimus.

En otro aspecto, los agentes de tratamiento utilizados 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 paratiroidea (PTHLH) (incluyendo anticuerpos de bloqueo) o formas recombinantes de los mismos (teriparatida correspondiente a los aminoácidos 7-34 de la PTH). Esta hormona actúa mediante la estimulación de los osteoclastos y el aumento de su actividad.

- El ranelato de estroncio: es un tratamiento oral alternativo y forma parte del grupo de fármacos denominados "agentes de doble acción en hueso" (DABA), ya que estimulan la proliferación de osteoblastos e inhiben la de los osteoclastos.

- "Moduladores del receptor de estrógeno" (SERM) se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de los estrógenos al receptor, independientemente del mecanismo. Ejemplos de moduladores del receptor de estrógeno incluyen, entre otros, estrógenos, progestágeno, estradiol, droloxifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, TSE-424, tamoxifeno, idoxifeno, L Y353381, LY117081, toremifeno, fluestrant, 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-2H-1-benzopirán-3-il)-fenil-2,2-dimetilpropanoato, 4,4'-dihidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenilhidrazona y SH646.

- Calcitonina: inhibe directamente la actividad de los osteoclastos a través del receptor de calcitonina. Los receptores de calcitonina se han identificado en la superficie de los osteoclastos.

- Bifosfonatos: son un grupo de medicamentos utilizados para la prevención y el tratamiento de enfermedades con resorción y reabsorción ósea tales como la osteoporosis y el cáncer con metástasis ósea, estando este último, con o sin hipercalcemia, asociado al cáncer de mama y al cáncer de próstata. Ejemplos de los bifosfonatos que pueden usarse en la terapia diseñada por medio del quinto método de la invención incluyen, aunque no se limitan a, los bisfosfonatos nitrogenados (tales como pamidronato, neridronato, olpadronato, alendronato, ibandronato, risedronato, incadronato, zoledronato o ácido zoledrónico, etc.) y bifosfonatos no nitrogenados (tales como el etidronato, clodronato, tiludronato, etc.).

- "Inhibidores de la catepsina K" se refiere a compuestos que interfieren en la actividad cisteína proteasa de la catepsina K. Ejemplos no limitantes de inhibidores de la catepsina K incluyen derivados de 4-amino-pirimidina-2-carbonitrilo (descrito en la solicitud de patente internacional WO 03/020278 con el nombre de Novartis Pharma GmbH), pirrolo-pirimidinas descritas en la publicación WO 03/020721 (Novartis Pharma GmbH) y la publicación WO 04/000843 (AstraZeneca AB), así como los inhibidores descritos en el documento PCT WO 00/55126 de Axys Pharmaceuticals,

WO 01/49288 de Merck Frosst Canada & Co. y Axys Pharmaceuticals.

- "Inhibidor de DKK-1 (Dickkopf-1)" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que es capaz de reducir la actividad de DKK-1. DKK-1 es un antagonista soluble de la ruta de Wnt que se expresa predominantemente en el hueso adulto y está regulado positivamente 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 de primera clase. Los estudios preclínicos apoyan la hipótesis de que BHQ880 promueve la formación de hueso y por lo tanto inhibe la enfermedad osteolítica inducida por tumor (Ettenberg S. *et al*, American Association for Cancer Research Annual Meeting 12 a 16 de abril de 2008; San Diego, Calif. Resumen).

- "Inhibidor doble de MET y VEGFR2" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que es un potente inhibidor doble de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape tumoral mediado por MET. MET se expresa no sólo en las células tumorales y las células endoteliales, sino también en los osteoblastos (células formadoras de hueso) y osteoclastos (células eliminadoras de hueso). HGF se une a MET en todos estos tipos de células, dando a la ruta de MET un papel importante en múltiples bucles autocrinos y paracrinos. La activación de MET en las células tumorales parece ser importante en el establecimiento de las lesiones óseas metastásicas. Al mismo tiempo, la activación de la ruta de MET en osteoblastos y osteoclastos puede conducir a características patológicas de metástasis óseas, incluyendo crecimiento óseo anómalo (es decir, lesiones blásticas) o destrucción (es decir, lesiones líticas). Así, la selección como diana de la ruta de MET puede ser una estrategia viable para prevenir el establecimiento y la progresión de las lesiones óseas metastásicas. Cabozantinib (Exelixis, Inc.), anteriormente conocido como XL184 (CAS 849217-68-1), es un potente inhibidor doble de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape tumoral mediado por MET. En múltiples estudios preclínicos cabozantinib ha demostrado destruir células tumorales, reducir las metástasis e inhibir la angiogénesis (la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para permitir el crecimiento tumoral). Otros inhibidores dobles adecuados son E7050 (N-[2-fluoro-4-((2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonilaminopiridin-4-il)oxi)fenil]-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida (2R, 3R)-tartrato) (CAS 928037-13-2) o Foretinib (también conocido como GSK1363089, XL880, CAS 849217-64-7).

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

- una proteína RANK adecuada que es capaz de unirse a RANKL y que comprende la totalidad o un fragmento del dominio extracelular de una proteína RANK. La proteína RANK soluble puede comprender el péptido señal y el dominio extracelular de los polipéptidos RANK murino o humano, o alternativamente, se puede utilizar la forma madura de la proteína con el péptido señal.
- Osteoprotegerina o una de sus variantes, 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 anticuerpo que es capaz de unirse específicamente al ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) inhibiendo una o más funciones de RANKL. Los anticuerpos se pueden preparar usando cualquiera de los métodos que son conocidos por el experto en la técnica. Así, los anticuerpos policlonales se preparan por medio de la inmunización de un animal con la proteína que va a inhibirse. Los anticuerpos monoclonales se preparan utilizando 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 variable de unión a antígeno 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 únicas estructurales y funcionales de anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural. La tecnología de los nanocuerpos fue desarrollada originalmente tras el 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 donde FR1 a FR4 son las regiones de entramado 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 con plena capacidad de unión al antígeno igual que la cadena pesada original del anticuerpo. Estos dominios VHH recién descubiertos con sus propiedades únicas estructurales y funcionales forman la base de una nueva generación de anticuerpos terapéuticos que Ablynx ha denominado nanocuerpos.

En una realización, el inhibidor de RANKL se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo específico anti-RANKL, un nanocuerpo específico anti-RANKL y la 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, CAS número 615258-40-7. Denosumab es un anticuerpo monoclonal completamente humano que se une a RANKL e impide su activación (RANKL no se une al receptor RANK). Diversos aspectos de Denosumab se cubren 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 Denosumab.

En una realización preferida, el nanocuerpo anti-RANKL es cualquiera de los nanocuerpos que se describen en el documento WO2008142164. En una realización aún 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 ciertos medicamentos, y para restablecer el equilibrio del metabolismo del hueso sano.

En una realización preferida, el agente de prevención de la degradación de los huesos se selecciona del grupo que consiste en un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, inhibidor de PTH y PTHLH o un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor doble de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógeno, la calcitonina radio-223 y un inhibidor de la cathepsina K. En una realización más preferida, el agente de prevención de la degradación del hueso es un bisfosfonato. En una realización aún más preferida, el bisfosfonato es el ácido zoledrónico.

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

En una realización preferida, el inhibidor doble de MET y VEGFR2 se selecciona del grupo que consiste en Cabozantinib, Foretinib y E7050.

En una realización preferida la terapia de radio 223 es Alpharadin.

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

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

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el riesgo de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo, que comprende determinar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de dicho sujeto donde un nivel de expresión de dicho gen por encima del valor promedio más una desviación estándar es indicativo de un aumento del riesgo de metástasis ósea temprana.

En una realización preferida, la metástasis ósea es metástasis ósea muy temprana.

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

“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.

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

El cuarto método de la invención comprende, en una primera etapa, cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de un sujeto que padece cáncer de mama, tal como cáncer de mama triple negativo (tipo basal). En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

En una realización preferida, el cuarto método de la invención comprende cuantificar únicamente el nivel de expresión del gen c-MAF como marcador único, es decir,

El método no implica determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional. El nivel de expresión del gen c-MAF puede cuantificarse como se ha dado a conocer para el primer método de la invención.

En una realización preferida, el cáncer de mama es cáncer de mama triple negativo, incluyendo cáncer de mama de tipo basal, incluyendo luminal A y B.

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

“Nivel promedio” tal como se usa en el presente documento se refiere a un valor único del nivel de expresión c-MAF (como media, modo o mediana) que resume o representa la significación general de un conjunto de valores desiguales. En una realización preferida el nivel promedio corresponde al promedio de 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 se está tratando de evaluar.

“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 c-MAF es la dispersión de una colección de los niveles de c-MAF encontrados en muestras de tumores de mama. Cuanto más separados los datos, mayor será la desviación. La desviación estándar se puede obtener extrayendo la raíz cuadrada de la media de las desviaciones cuadradas de los valores observados de su media en una distribución de frecuencia.

Una vez que el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de un sujeto con cáncer de mama, tal como cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), 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 a nivel promedio, se puede concluir entonces que dicho sujeto tiene una mayor tendencia a desarrollar metástasis ósea temprana.

Método para diseñar una terapia personalizada en pacientes con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), con metástasis ósea

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) con metástasis ósea (a continuación en el presente documento, quinto método de la invención) que comprende

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

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

donde si el nivel de expresión del gen c-MAF está aumentado con respecto a dicho valor de referencia, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia para prevenir la degradación ósea.

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

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

En una realización preferida, el quinto método de la invención comprende cuantificar únicamente el nivel de expresión del gen c-MAF como marcador único, es decir, el método no implica determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional.

En una segunda etapa, se compara el nivel de expresión del gen c-MAF (o translocación o amplificación de c-MAF) obtenido en la muestra tumoral del sujeto con el valor de referencia. En una realización preferida, el valor de referencia es el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de control. Dependiendo del tipo de tumor a analizar, la naturaleza exacta de la muestra de control puede variar. Por tanto, en el caso que implica el quinto método de la invención, entonces la muestra de referencia es una muestra de un sujeto con cáncer de mama que no ha padecido metástasis o que corresponde al valor de la mediana del nivel de expresión del gen c-MAF medido en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de mama que no han padecido metástasis.

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

Ejemplos ilustrativos de los agentes utilizados para evitar y/o prevenir la degradación ósea incluyen, aunque no se limitan a:

- Inhibidores de la hormona paratiroidea (PTH) y hormona similar a la hormona paratiroidea (PTHrP) (incluyendo anticuerpos de bloqueo) o formas recombinantes de los mismos (teriparatida correspondiente a los aminoácidos 7-34 de PTH). Esta hormona actúa estimulando los osteoclastos y aumentando su actividad.

- Ranelato de estroncio: es un tratamiento oral alternativo, y forma parte del grupo de fármacos denominados "agentes óseos de doble acción" (DABA) porque estimulan la proliferación de osteoblastos e inhiben la proliferación de osteoclastos.

- "Moduladores de receptores de estrógeno" (SERM) se refieren a compuestos que interfieren o inhiben la unión de estrógenos al receptor, independientemente del mecanismo. Ejemplos de moduladores de receptores de estrógeno incluyen, entre otros, estrógenos, progestágeno, estradiol, droloxifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, TSE-424, tamoxifeno, idoxifeno, LY353381, LY117081, toremifeno, fluevestrant, 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-(2-(1-piperidinil)etoxil)fenil]-2H-1-benzopiran-3-il]-fenil)-2,2-dimetilpropanoato, 4,4'-dihidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenil-hidrazona y SH646.

- Calcitonina: inhibe directamente la actividad de los osteoclastos a través del receptor de calcitonina. Los receptores de calcitonina se han identificado en la superficie de los osteoclastos.

- Bisfosfonatos: son un grupo de medicamentos utilizados para la prevención y el tratamiento de enfermedades con resorción y reabsorción ósea tales como la osteoporosis y el cáncer con metástasis ósea, siendo este último con o sin hipercalcemia, asociado al cáncer de mama y al cáncer de próstata. Ejemplos de bisfosfonatos que pueden utilizarse en la terapia diseñada por medio del quinto método de la invención incluyen, aunque no limitándose 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.).

- Alpharadin (dicloruro de radio-223). Alpharadin usa radiación alfa de la desintegración del radio-223 para destruir las células cancerosas. El radio-223 se autodirige de manera natural a metástasis óseas en virtud de sus propiedades como imitador de calcio. La radiación alfa tiene un alcance muy corto de 2-10 células (en comparación con la radioterapia actual que se basa en la radiación beta o gamma) y, por lo tanto, causa menos daño a los tejidos sanos circundantes (particularmente la médula ósea). Con propiedades similares al calcio, el radio-223 se atrae a lugares donde se usa el calcio para formar huesos en el cuerpo, incluyendo el sitio de crecimiento óseo anómalo y más rápido, tal como el que se observa en las metástasis esqueléticas de hombres con cáncer de próstata avanzado, resistente a la castración. El radio-223, después de la inyección, se transporta en el torrente sanguíneo a sitios de crecimiento óseo anómalo. El lugar donde comienza un cáncer en el cuerpo se conoce como tumor primario. Algunas de estas células pueden separarse y transportarse en el torrente sanguíneo a otra parte del cuerpo. Las células cancerosas pueden asentarse en esa parte del cuerpo y formar un nuevo tumor. Si esto sucede, se denomina cáncer secundario o metástasis. La mayoría de los pacientes con cáncer de próstata en estadio tardío padecen la carga máxima de la enfermedad en sus huesos. El objetivo con radio-223 es atacar selectivamente este cáncer secundario. Cualquier radio-223 no absorbido en los huesos se dirige rápidamente al intestino y se excreta.

- "Inhibidores de la cathepsina K" se refiere a los compuestos que interfieren en la actividad cisteína proteasa de la cathepsina K. Los ejemplos no limitativos de inhibidores de la cathepsina K incluyen los derivados de 4-amino-pirimidina-2-carbonitrilo (descritos en la solicitud de patente internacional WO 03/020278 con el nombre de Novartis Pharma GMBH), pirrolo-pirimidinas descritas en la publicación WO 03/020721 (Novartis Pharma GMBH) y la publicación WO 04/000843 (ASTRAZENECA AB) así como los inhibidores descritos en las publicaciones PCT WO 00/55126 de Axys Pharmaceuticals, WO 01/49288 de Merck Frosst Canada & Co. y Axys Pharmaceuticals.

- "Inhibidor de DKK-1 (Dickkopf-1)" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto capaz de reducir la actividad de DKK-1. DKK-1 es un antagonista soluble de la ruta de Wnt expresado predominantemente en hueso adulto y regulado positivamente en pacientes con mieloma con lesiones osteolíticas. Los agentes dirigidos a 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, de primera clase. Los estudios preclínicos apoyan la hipótesis de que BHQ880 promueve la formación y de ese modo inhibe la enfermedad osteolítica inducida por tumores (Ettenberg S. *et al.*, American Association for Cancer Research Annual Meeting. 16-12 de abril de 2008; San Diego, California. Resumen).

- "Inhibidor doble de MET y VEGFR2" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que

sea un potente inhibidor doble de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape tumoral mediado por MET. MET se expresa no solo en células tumorales y células 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 da a la ruta de MET un papel importante en múltiples bucles autocrinos y paracrinos. La activación de MET en las células tumorales parece ser importante en el establecimiento de lesiones óseas metastásicas. Al mismo tiempo, la activación de la ruta de MET en osteoblastos y osteoclastos puede conducir a rasgos patológicos de metástasis óseas, incluyendo crecimiento óseo anómalo (es decir, lesiones blásticas) o destrucción (es decir, lesión lítica). Por tanto, la selección como diana de la ruta de MET puede ser una estrategia viable para prevenir el establecimiento y la progresión de lesiones óseas metastásicas. Cabozantinib (Exelixis, Inc), anteriormente conocido como XL184 (CAS 849217-68-1), es un potente inhibidor doble de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape tumoral mediado por MET. En múltiples estudios preclínicos se ha demostrado que cabozantinib destruye las células tumorales, reduce las metástasis e inhibe la angiogénesis (la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para soportar el crecimiento tumoral). Otros inhibidores dobles adecuados son E7050 (N-[2-fluoro-4-((2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonilaminopiridin-4-il}oxi)fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida (2R,3R)-tartrato) (CAS 928037-13-2) o Foretinib (también conocido como SK1363089, XL880, CAS 849217-64-7).

- "Inhibidores de RANKL" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto capaz de reducir la actividad RANKL. RANKL se encuentra en la superficie de la membrana de osteoblastos del estroma y linfocitos T, y estos linfocitos T son los únicos 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 mediante el bloqueo de 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 capaz de unirse RANKL y que comprende la totalidad o un fragmento del dominio extracelular de una proteína RANK. El RANK soluble puede comprender el péptido señal y el dominio extracelular de los polipéptidos RANK murinos o humanos, o alternativamente, se puede utilizar la forma madura de la proteína con el péptido señal eliminado.
- Osteoprotegerina o una variante de la misma con capacidad de unión a RANKL.
- Moléculas antisentido específicas de RANKL.
- Ribozimas capaces de procesar los productos transcritos de RANKL.
- Anticuerpos anti-RANKL específicos. "Anticuerpo anti-RANKL o anticuerpo dirigido contra RANKL" se entiende en el presente documento como todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse específicamente al ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) inhibiendo una o más funciones de RANKL. Los anticuerpos se pueden preparar usando cualquiera de los métodos conocidos por el experto en la técnica. Por tanto, los anticuerpos policlonales se preparan por medio de la inmunización de un animal con la proteína a inhibir. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Kohler, Milstein *et al.* (Nature, 1975, 256: 495). Los anticuerpos adecuados en el contexto de la presente invención incluyen anticuerpos intactos que comprenden una región variable de unión a antígeno y una región constante, fragmentos "Fab", "F(ab')₂" y "Fab", Fv, scFv, diacuerpos y anticuerpos biespecíficos.
- Nanocuerpos anti-RANKL específicos. Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural. La tecnología de nanocuerpos se desarrolló originalmente tras el 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

donde FR1 a FR4 son las regiones de entramado 1 a 4, CDR1 a CDR3 son las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un dominio variable único (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). De manera importante, el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga la capacidad de unión a antígeno completa del anticuerpo original de cadena pesada. 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 nanocuerpos.

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 totalmente humano que se une a RANKL y previene su activación (no se une al receptor RANK). Diversos aspectos

de Denosumab están cubiertos por las patentes de 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 Denosumab.

5 En una realización preferida, el nanocuerpo anti-RANKL es cualquiera de los nanocuerpos descritos en el documento WO2008142164. En una realización aún más preferida, el anticuerpo anti-RANKL es el ALX-0141 (Ablynx). ALX-0141 se ha diseñado para inhibir la pérdida ósea asociada con osteoporosis posmenopáusica, artritis reumatoide, cáncer y ciertos medicamentos, y para restaurar el equilibrio del metabolismo del hueso sano.

10 En una realización preferida, el agente que previene la degradación ósea se selecciona del grupo que consiste en un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, inhibidor de PTH y PTHLH o un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor doble de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógeno, radio-223, calcitonina y un inhibidor de 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.

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

En una realización preferida el inhibidor doble de MET y VEGFR2 se selecciona del grupo que consiste en Cabozantinib, Foretinib y E7050.

30 En una realización preferida la terapia de radio 223 es Alpharadin.

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

Método de pronóstico de metástasis en cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) basándose en la detección de la amplificación del gen c-MAF

40 En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* (en lo sucesivo sexto método de la invención) para predecir la metástasis ósea de un cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) en un sujeto que padece dicho cáncer, que comprende la determinación de si el gen c-MAF está amplificado en una muestra de dicho sujeto con respecto a un número de copias de gen de referencia en el que una amplificación del gen c-MAF con respecto a dicho número de copias de gen de referencia es indicativo de un mayor riesgo de desarrollar metástasis ósea.

45 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 Chr 16 - de aproximadamente 79.392.959 pb a aproximadamente 79.663.806 pb (de centrómero a telómero). En algunas realizaciones, la amplificación se encuentra en la región genómica entre aproximadamente Chr. 16 - 79.392.959 pb a aproximadamente 79.663.806 pb, pero excluyendo los elementos repetitivos de ADN. En algunas realizaciones, la amplificación se mide usando una sonda específica para esa región.

50 En una realización particular, el grado de amplificación del gen c-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 la amplificación del gen c-MAF es el locus 16q22-q24 que incluye el gen c-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 NCBI con los cóntigos NT_010498.15 y NT_010542.15. En otra realización preferida, el grado de amplificación del gen c-MAF puede determinarse mediante la utilización de una sonda específica para dicho gen. En otra realización preferida, la amplificación del gen c-MAF se determina mediante el uso de la sonda de fusión doble Vysis LSI IGH / MAF Dual Color, que comprende una sonda contra 14q32 y 16q23.

55 El sexto método de la invención comprende, en una primera etapa, determinar si el gen c-MAF está amplificado en una muestra de un sujeto. En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral. A tal fin, la amplificación del gen c-MAF en la muestra de tumor se compara con respecto a una muestra de control.

En una realización particular, el sexto método de la invención para el pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis ósea en un sujeto con cáncer de mama, comprende la determinación del número de copias de gen c-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 c-MAF es mayor con respecto al número de copias de c-MAF de una muestra de control, entonces el sujeto tiene una mayor tendencia a desarrollar metástasis ósea.

La muestra de control se refiere a una muestra de un sujeto con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) que no ha padecido metástasis o que corresponde al valor de la mediana del número de copias de gen c-MAF medido en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsias de sujetos con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), respectivamente, que no han padecido metástasis. Dicha muestra de referencia se obtiene normalmente mediante la combinación de cantidades iguales de muestras de una población. Si el número de copias de gen c-MAF se incrementa con respecto al número de copias de dicho gen en la muestra de control, entonces el sujeto tiene una mayor tendencia a desarrollar metástasis.

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

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

Los métodos para determinar si el gen c-MAF o la región cromosómica 16q22-q24 están amplificados son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Dichos métodos incluyen, sin limitación, la hibridación *in situ* (ISH) (tal como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), hibridación *in situ* cromogénica (CISH) o hibridación *in situ* de plata (SISH)), la 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 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.

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica citogenética que se utiliza para detectar y localizar la presencia o ausencia de secuencias específicas de ADN en los cromosomas. La técnica de FISH utiliza sondas fluorescentes que sólo 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 utilizando reacciones enzimáticas, tales como traducción de muescas o PCR. La muestra que contiene el material genético (los cromosomas) se coloca sobre portaobjetos de vidrio y se desnaturaliza por un tratamiento con formamida. La sonda marcada se hibrida entonces con la muestra que contiene el material genético en condiciones adecuadas que serán determinadas por 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 (utilizando anticuerpos marcados con fluorescencia para detectar el hapteno).

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

Cualquier molécula marcada o etiquetada que puede unirse a un ADN puede utilizarse para etiquetar las sondas utilizadas en el cuarto método de la invención, permitiendo así la detección de moléculas de ácidos nucleicos. Ejemplos de etiquetas para el etiquetado incluyen, aunque no se limitan a, isótopos radiactivos, sustratos de enzimas, cofactores, ligandos, agentes de quimioluminiscencia, fluoróforos, haptenos, enzimas y combinaciones de los mismos. Pueden encontrarse métodos para el etiquetado y directrices para seleccionar marcadores adecuados para diferentes propósitos, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) y Ausubel *et al.* (en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Nueva York, 1998).

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

Es necesario que la determinación de la amplificación del gen c-MAF se correlacione con los valores de una muestra de control o muestra de referencia que corresponde al nivel de amplificación del gen c-MAF medido en una muestra de un sujeto con cáncer de mama que no ha padecido metástasis o que corresponde al valor de la mediana de la amplificación del gen c-MAF medida en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsias de sujetos con cáncer de mama que no han padecido metástasis. Dicha muestra de referencia se obtiene normalmente mediante la combinación de cantidades iguales de muestras de una población de sujetos. En general, las muestras de referencia

típicas se obtendrán a partir de sujetos que están clínicamente bien documentados y en los cuales la ausencia de metástasis está bien caracterizada. La recogida de muestras de las que se deriva el nivel de referencia preferiblemente se compone de sujetos que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente objeto del estudio. Una vez que este valor de la mediana se ha establecido, el nivel de amplificación de c-MAF en los tejidos tumorales de pacientes puede compararse con este valor de la mediana, y por lo tanto, si hay amplificación, el sujeto tiene una mayor tendencia a desarrollar metástasis.

En una realización preferida, la metástasis ósea es la 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 resorción ósea (pérdida progresiva de la densidad ósea) en la proximidad de la metástasis resultante de la estimulación de la actividad de los osteoclastos por las células tumorales y se caracteriza por dolor severo, fracturas patológicas, hipercalcemia, compresión de la médula espinal y otros síndromes que resultan de la compresión de los nervios.

Método de pronóstico de metástasis en cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) basándose en la detección de la translocación del gen c-MAF

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir el resultado clínico de un paciente que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), que comprende determinar si el gen c-MAF está translocado en una muestra de dicho sujeto en el que una translocación del gen c-MAF es indicativa de un mal resultado clínico.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir el resultado clínico de un paciente que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), que comprende determinar si el gen c-MAF está translocado en una muestra de dicho sujeto en el que una translocación del gen c-MAF es indicativa de un mal resultado clínico.

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

En una realización particular, la translocación del gen c-MAF puede determinarse mediante la determinación de la translocación de una región cromosómica que contiene dicho gen. En una realización, la translocación es la translocación t(14,16). En otra realización, la región cromosómica que se transloca es del locus 16q22-q24. El locus 16q22-q24 se ubica en el cromosoma 16, en el brazo largo de dicho cromosoma y en un intervalo entre la banda 22 y la banda 24. Esta región corresponde en la base de datos NCBI con los cóntigos NT_010498.15 y NT_010542.15. En una realización preferida, el gen c-MAF se transloca al cromosoma 14 en el locus 14q32, dando como resultado la translocación t(14,16)(q32, q23). Esta translocación coloca el gen MAF junto a los potenciadores fuertes en el locus de IgH, lo que en algunos casos, conduce a la sobreexpresión de MAF. (Eychene, A., Rocques, N., y Puopponnot, C., A new *MAF*ia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8: 683-693).

En una realización preferida, la translocación del gen c-MAF puede determinarse mediante el uso de una sonda específica para dicha translocación. En algunas realizaciones, la translocación se mide usando una sonda de doble color. En algunas realizaciones, la translocación se mide usando una sonda de fusión doble. En algunas realizaciones, la translocación se mide usando una sonda de fusión doble de doble color. En algunas realizaciones, la translocación se mide usando dos sondas separadas.

En otra realización preferida, la translocación del gen c-MAF se determina usando la sonda de fusión doble 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>; visitado por última vez el 5/11/2012), que comprende una sonda contra 14q32 y 16q23. En otra realización preferida, la translocación del gen c-MAF se determina usando una sonda de fusión MAF/IGH gt(14;16) de Kreatech diagnostics (<http://www.kreatech.com/products/repeat-free-tm-poseidontm-fish-probes/hematology/maf-igh-gt1416-fusion-probe.html>; visitado por última vez el 5/11/2012), una sonda Abnova MAF FISH (http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?Catalog_id=FA0375; visitado por última vez el 5/11/2012), una sonda de translocación IGH/MAF Two Color, Two Fusion de Cancer Genetics Italia (<http://www.cancergeneticsitalia.com/dna-fish-probe/ighmaf/>; visitado por última vez el 5/11/2012), una sonda FISH IGH/MAF-t(14;16)(q32;q23) de Creative Bioarray (<http://www.creative-bioarray.com/products.asp?cid=35&page=10>; visitado por última vez el 5/11/2012), un panel de mieloma múltiple mediante FISH de Arup Laboratories (<http://www.aruplab.com/files/technical-bulletins/Multiple%20Myeloma%20%28MM%29%20by%20FISH.pdf>; visitado por última vez el 5/11/2012), una sonda de Agilent específica para 16q23 o 14q32 (<http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?chr=16&start=79483700&end=79754340>; visitado por última vez el 11/5/2012; <http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?Pageid=3000&ProductID=637>; visitado por última vez el 5/11/2012), una sonda de Dako específica para 16q23 o 14q32 (http://www.dako.com/us/ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?setCountry=true&purl=ar42/psg42806000/b

aseproducts_surefish.htm?undefined&submit=Accept%20country; visitado por última vez el 5/11/2012), una sonda de fusión doble de translocación IGH/MAF de Cytocell (http://www.zentech.be/uploads/docs/products_info/prenatalogy/cytocell%202012-2013%20catalogue%5B3%5D.pdf; visitado por última vez el 5/11/2012), una sonda de fusión doble de translocación XL IGH / MAF de Metasystems(http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com_joomla&view=article&joobase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272; visitado por última vez el 5/11/2012), un sonda FISH XL de Zeiss, 100 µl, IGH / MAFB (<https://www.microshop.zeiss.com/?s=440675675dedc6&l=en&p=uk&f=r&i=5000&o=&h=25&n=1&sd=000000-0528-231-uk>; visitado por última vez el 5/11/2012) o una sonda de fusión doble 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%2Fbrochureres%2Fmie6_86.ppt&ei=MHGyuo3g4GKWH0GKWH0GHTTgH0GIQdodw&usg=afqjcneqqmbt8v qgjjbi9rief31vgoffq&sig2=v5is8juemvnb18mV2xx_ww; visitado por última vez el 5/11/2012).

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

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

Una realización de la invención comprende un método en el que en una primera etapa se determina si el gen c-MAF está translocado en una muestra de un sujeto. En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

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

Los métodos para determinar si el gen c-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 c-MAF. Dichos métodos incluyen, sin limitación, la hibridación *in situ* (ISH) (tal como la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH), la hibridación *in situ* cromogénica (CISH) o la hibridación *in situ* de plata (SISH)), la hibridación comparativa genómica o la reacción en cadena de la polimerasa (tal como como PCR cuantitativa en tiempo real). Para cualquier método de ISH, la amplificación, el número de copias o la translocación pueden determinarse contando el número de puntos fluorescentes, puntos coloreados o puntos con plata en los cromosomas o en el núcleo. En otras realizaciones, la detección de alteraciones y translocaciones del número de copias puede detectarse mediante el uso de secuenciación del genoma completo, secuenciación de exomas o mediante el uso de cualquier tecnología derivada de PCR. Por ejemplo, puede realizarse PCR en muestras de ADN genómico para detectar la translocación. En una realización, se utiliza PCR cuantitativa. En una realización, la PCR se realiza con un cebador específico para el gen c-MAF y un cebador específico para la región promotora del IGH; si se produce un producto, se ha producido translocación.

En algunas realizaciones, se determina la amplificación y el número de copias de gen c-MAF después de determinar la translocación del gen c-MAF. En algunas realizaciones, la sonda se usa para determinar si la célula es poliploide para el gen c-MAF. En algunas realizaciones, se realiza una determinación de la poliploidía determinando si existen más de 2 señales del gen de interés. En algunas realizaciones, 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 resultado clínico en un cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), basándose en detectar la amplificación del gen c-MAF

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* (en lo sucesivo séptimo método de la invención) para predecir el resultado clínico de un paciente que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) que comprende la determinación de si el gen c-MAF está amplificado en una muestra de dicho sujeto con respecto a un número de copias de gen de referencia en el que una amplificación del gen c-MAF con respecto a dicho número de copias de gen de referencia es indicativa de un mal resultado clínico.

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

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

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

En otra realización, el número de copias de gen de referencia es el número de copias de gen en una muestra de cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) de un sujeto que no ha padecido metástasis ósea.

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

Método para diseñar una terapia personalizada en pacientes con tumores de mama triple negativos (incluyendo de tipo basal) o, alternativamente, tumores de mama ER+ o tumores de mama HER2+

Como se conoce en el estado de la técnica, el tratamiento que va a administrarse a un sujeto que padece cáncer depende de si éste 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 tal 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 la presente solicitud, dado que la amplificación o translocación del gen c-MAF en células de cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) está relacionada con la presencia de metástasis ósea, la amplificación o translocación del gen c-MAF es útil para la toma de decisiones en cuanto a la terapia más adecuada para el sujeto que padece dicho cáncer. En una realización preferida, la amplificación del gen c-MAF se determina mediante la determinación de la amplificación del locus 16q23 o 16q22-q24. En otra realización preferida, la amplificación del gen c-MAF se determina por medio del uso de una sonda específica del gen c-MAF.

Por tanto, en otro aspecto la invención se refiere a un método *in vitro* (a continuación en el presente documento tercer método de la invención) para diseñar una terapia personalizada para un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), que comprende

iii) cuantificar la amplificación o translocación del gen c-MAF en una muestra de dicho sujeto y

iv) comparar la amplificación o translocación génica obtenida en i) con un valor de referencia,

en el que si la amplificación o translocación del gen c-MAF está aumentada con respecto a dicho valor de referencia, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia con el objetivo de prevenir y/o tratar la metástasis ósea. Si la amplificación o translocación del gen c-MAF no está aumentada con respecto a dicho valor de referencia, entonces dicho sujeto no es susceptible de recibir una terapia con el objetivo de prevenir y/o tratar la metástasis ósea.

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

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

5 Otro método de la invención comprende cuantificar la amplificación o translocación del gen c-MAF en una muestra en un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal). En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

10 En otra realización particular, el método de la invención comprende cuantificar únicamente la amplificación o translocación del gen c-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 invención la muestra puede ser una muestra de tejido tumoral primario del sujeto.

15 En una segunda etapa, la amplificación o translocación del gen c-MAF obtenida en la muestra tumoral del sujeto se compara con un valor de referencia. En una realización preferida, el valor de referencia es la amplificación o translocación del gen c-MAF de dicho gen en una muestra de control. La determinación de la amplificación o translocación del gen c-MAF debe estar relacionada con los valores de una muestra de control o de referencia. Dependiendo del tipo de tumor a analizar, 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 triple negativo (incluyendo de tipo basal), que no ha metastatizado o que corresponde a la amplificación o translocación del gen c-MAF medida en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), que no ha metastatizado.

25 Una vez se ha medido la amplificación o translocación del gen c-MAF en la muestra y comparado con el valor de referencia, si la amplificación o translocación del gen de dicho gen está aumentada con respecto al valor de referencia, entonces se puede concluir que dicho sujeto es susceptible de recibir la terapia con el objetivo de prevenir (si el sujeto aún no ha padecido metástasis) y/o tratar la metástasis (si el sujeto ya ha experimentado metástasis).

30 Cuando el cáncer ha metastatizado, se pueden usar tratamientos sistémicos que incluyen, pero no se limitan a, quimioterapia, tratamiento hormonal, inmunoterapia o una combinación de estos. Además, se puede usar radioterapia y/o cirugía. La elección del tratamiento generalmente depende del tipo de cáncer primario, el tamaño, la ubicación de la metástasis, la edad, la salud general del paciente y los tipos de tratamientos usados anteriormente.

35 Los tratamientos sistémicos son aquellos que llegan a todo el cuerpo, tales como:

40 - 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 el tratamiento de radiación. Los tratamientos quimioterapéuticos adecuados para el cáncer de mama incluyen, sin limitación, antraciclinas (doxorrubicina, epirubicina, doxorrubicina liposomal pegilada), taxanos (paclitaxel, docetaxel, paclitaxel, paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina), 5-fluorouracilo (infusión continua 5-FU, 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 doxorrubicina/ciclofosfamida (AC), epirubicina/ciclofosfamida, (EC) ciclofosfamida/epirubicina/5-fluorouracilo (CEF), ciclofosfamida/doxorrubicina/5-fluorouracilo (CAF), 5-fluorouracilo/epirubicina/ciclofosfamida (FEC)), ciclofosfamida/metotrexato/5-fluorouracilo (CMF), antraciclinas/taxanos (tales como doxorrubicina/paclitaxel o doxorrubicina/docetaxel), docetaxel/capecitabina, gemcitabina/paclitaxel, regímenes de taxano/platino (tales como paclitaxel/carboplatino o docetaxel/carboplatino).

50 - 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 metástasis en pacientes. Estos incluyen, pero no se limitan a citocinas, anticuerpos monoclonales y vacunas antitumorales.

55 En otro aspecto, el tratamiento es Alpharadin (dicloruro de radio-223). Alpharadin usa radiación alfa de la desintegración del radio-223 para destruir las células cancerosas. El radio-223 se autodirige de manera natural a metástasis óseas en virtud de sus propiedades como imitador de calcio. La radiación alfa tiene un alcance muy corto de 2-10 células (en comparación con la radioterapia actual que se basa en la radiación beta o gamma) y, por lo tanto, causa menos daño a los tejidos sanos circundantes (particularmente la médula ósea). Con propiedades similares al calcio, el radio-223 se atrae a lugares donde el calcio se usa para construir hueso en el cuerpo, incluyendo el sitio de crecimiento óseo más rápido y anómalo, tal como el observado en las 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 a sitios de crecimiento óseo anómalo. El lugar donde comienza un cáncer en el cuerpo se conoce como tumor primario. Algunas de estas células pueden separarse y transportarse en el torrente sanguíneo a otra parte del cuerpo. Las células cancerosas pueden asentarse en esa parte del cuerpo y formar un nuevo tumor. Si esto sucede, se denomina cáncer secundario o metástasis. La mayoría de los pacientes con cáncer de próstata en estadio avanzado padecen la carga máxima de la enfermedad en sus huesos. El objetivo con radio-223 es atacar selectivamente este

cáncer secundario. Cualquier radio-223 no absorbido en los huesos se dirige rápidamente al intestino y se excreta.

En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de mTor. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor es un inhibidor doble de mTor/PI3cinasa. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para prevenir o inhibir 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 liberadora de sirolimús biomanipulada Combo de ORBUSNEICH (sirolimús), Curaxin CBLC102 (mepacrina), DE109 (sirolimús), DS3078, Endeavour DES (zotarolimús), Endeavour Rolute (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), Rolute DES (zotarolimús), RG7422, SAR245409, SF1126, SGN75 (vorsetuzumab mafodotina), Synergy (everolimús), Taltorvic (ridaforolimús), Tarceva (erlotinib), Torisel (temsirolimús), Xience Prime (everolimús), Xience V (everolimús), Zomaxx (zotarolimús), Zortress (everolimús), endoprótesis periférica liberadora de zotarolimús de MEDTRONIC (zotarolimús), AP23841, AP24170, ARmTOR26, BN107, BN108, Canstatin GENZYME (canstatina), CU906, EC0371, EC0565, KI1004, LOR220, NV128, Rapamicina ONCOIMMUNE (sirolimús), SB2602, Sirolimus PNP SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS (sirolimús), TOP216, VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, Advacan (everolimús), AZD8055, endoprótesis coronaria liberadora de sirolimús Cypher Select Plus de (sirolimús), endoprótesis coronaria liberadora de sirolimús Cypher (sirolimús), globo revestido de fármaco (sirolimús), E-Magic Plus (sirolimús), Emtor (sirolimús), Esprit (everolimús), Evertor (everolimús), HBF0079, LCP-Siro (sirolimús), Limus CLARIS (sirolimús), inhibidor de mTor CELLZOME, endoprótesis coronaria liberadora de sirolimús Nevo (sirolimús), nPT-mTor, Rapacan (sirolimús), Renacept (sirolimús), Re-Zolve (sirolimús), Rocas (sirolimús), SF1126, Sirolim (sirolimús), Sirolimus NORTH CHINA (sirolimús), Sirolimus RAn Ba XY (sirolimús), Sirolimus Wa TSON (sirolimús) Siopan (sirolimús), Sirova (sirolimús), Supralimus (sirolimús), Supralimus-Core (sirolimús), Tacrolimus WATSON (tacrolimús), Tafa93, Temsirolimus ACCORD (temsirolimús), Temsirolimus 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; visitado por última vez el 28/11/2012). En otro aspecto, se combina everolimús con un inhibidor de la aromatasa. (Véase, por ejemplo, Baselga, J., *et al.*, Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366(6): 520-529. En otro aspecto, los inhibidores de mTor se pueden identificar a través de métodos conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Zhou, H. *et al.* Updates of inhibitors of mTor. 2010. Anticancer Agents Med. Chem. 10(7): 571-81. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se usa para tratar o prevenir o inhibir 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 o prevenir o inhibir 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 Src cinasa. En algunos aspectos, el inhibidor de Src se usa para prevenir o inhibir metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de Src cinasa se selecciona del grupo: AZD0530 (saracatinib), Bosulif (bosutinib), ENMD981693, KD020, KX01, Sprycel (dasatinib), Yervoy (ipilimumab), AP23464, AP23485, AP23588, AZD0424, inhibidor de c-Src cinasa KISSEI, CU201, KX2361, SKS927, SRN004, SUNK706, TG100435, TG100948, AP23451, Dasatinib HETERO (dasatinib), Dasatinib VALEANT (dasatinib), Fontrax (dasatinib), inhibidor de Src cinasa KINEX, VX680, (lactato de tozasertib), XL228 y SUNK706. En algunas realizaciones, el inhibidor de Src cinasa es dasatinib. En otro aspecto, los inhibidores de Src cinasa se pueden identificar a través de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sen, B. y Johnson, F.M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. 2011. J. Signal Transduction. 2011: 14 páginas. En algunos aspectos, el inhibidor de Src cinasa se usa para tratar o prevenir o inhibir metástasis en un paciente que es positivo para la firma sensible a SRC (SRS). En algunos aspectos, el paciente es SRS+ y ER-. (Véase, por ejemplo, Zhang, CH. -F, *et al.* Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent survival signals. 2009. Cancer Cell. 16:67-78). En algunos aspectos, el inhibidor de Src cinasa se usa para tratar o prevenir o inhibir metástasis en un paciente con cáncer de mama avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de Src cinasa se usa en combinación con un segundo tratamiento. En algunos aspectos, el segundo tratamiento es cualquier tratamiento descrito en el presente documento.

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

MRX7EAT (etodolaco), naproxeno IROKO (naproxeno), NCX4016 (nitroaspirina), NCX701 (nitroacetaminofeno), Nuprin SCOLR (ibuprofeno), OMS103HP (clorhidrato de amitriptilina, ketoprofeno, clorhidrato de oximetazolina), Oralease (diclofenaco), OxycoDex (dextrometorfeno, oxicodona), P54, PercoDex (acetaminofeno, dextrometorfano, oxicodona), PL3100 (naproxeno, fosfatidil colina), PSD508, R-ketoprofeno (ketoprofeno), Remura (bromfenaco sódico), ROX828 (ketorolaco trometamina), RP19583 (ketoprofeno lisina), RQ00317076, SDX101 (R-etodolaco), TDS943 (diclofenaco sódico), TDT070 (ketoprofeno), TPR100, TQ1011 (ketoprofeno), TT063 (S-flurbiprofeno), UR8880 (cimicoxib), V0498TA01A (ibuprofeno), VT122 (etodolaco, propranolol), XP20B (acetaminofeno, dextropropoxifeno), XP21B (diclofenaco potásico), XP21L (diclofenaco potásico), Zoenasa (acetilcisteína, mesalamina), Acephen, Actifed Plus, Actifed-P, Acular, Acular LS, Acular PF, Acular X, Acuvail, Advil, Advil Allergy Sinus, Advil Cold and Sinus, Advil Congestion Relief, Advil PM, Advil PM Capsule, Air Salonas, Airtal, Alcohol-Free NyQuil Cold & Flu Relief, Aleve, Aleve ABDI IBRAHIM, Aleve-D, Alka-Seltzer, Alka-Seltzer BAYER, Alka-Seltzer Extra Strength, Alka-Seltzer Lemon-Lime, Alka-Seltzer Original, Alka-Seltzer Plus, Alka-Seltzer plus Cold and Cough, Alka-Seltzer plus Cold and Cough Formula, Alka-Seltzer Plus Day and Night Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Day Non-Drowsy Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Flu Formula, Alka-Seltzer Plus Night Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Sinus Formula, Alka-Seltzer Plus Sparkling Original Cold Formula, Alka-Seltzer PM, Alka-Seltzer Wake-Up Call, Anacin, Anaprox, Anaprox MINERVA, Ansaid, Apitoxin, Apranax, Apranax abdi, Arcoxia, Arthritis Formula Bengay, Arthrotec, Asacol, Asacol HD, Asacol MEDUNA ARZNEIMITTEL, Asacol ORIFARM, Aspirina BAYER, Aspirina Complex, Aspirina Migran, AZD3582, Azulfidine, Baralgin 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 ANGE LiNI, Bromday, Bufferin, Buscopan Plus, Caldolor, Calmatel, Cambia, Canasa, Capoxigem, Cataflam, Celebrex, Celebrex ORIFARM, Advil Allergy Sinus infantil, Tylenol infantil, Tylenol Cough and Runny Nose infantil, Tylenol plus cold infantil, Tylenol plus Cold and Cough infantil, Tylenol plus cold and stuffy nose infantil, Tylenol plus Flu infantil, Tylenol plus cold & allergy infantil, Tylenol plus Cough & Runny Nose infantil, Tylenol plus Cough & Sore Throat infantil, Tylenol plus multi symptom cold infantil, Clinoril, Codral Cold and Flu, Codral Day and Night Day en comprimidos, Codral Day and Night Night en comprimidos, Codral Nighttime, Colazal, Combunox, Contac Cold plus Flu, Contac Cold plus Flu Non-Drowsy, Coricidin D, Coricidin HBP Cold and Flu, Coricidin HBP Day and Night Multi-Symptom Cold, Coricidin HBP Maximum Strength Flu, Coricidin HBP Nighttime Multi-Symptom Cold, Coricidin II Extra Strength Cold and Flu, CS502, CS670, Daypro, Daypro Alta, DDS06C, Demazin Cold and Flu, Demazin Cough, Cold and Flu, Demazin day/night Cold and Flu, Demazin PE Cold and Flu, Demazin PE day/night Cold and Flu, Diclofenac HPBCD, Dimetapp Day Relief, Dimetapp Multi-Symptom Cold and Flu, Dimetapp Night Relief, Dimetapp Pain and Fever Relief, Dimetapp PE Sinus Pain, Dimetapp PE Sinus Pain plus Allergy, Dipentum, Diractin, Disprin Cold 'n' Fever, Disprin Extra, Disprin Forte, Disprin Plus, Dristan Cold, Dristan Junior, Drixoral Plus, Duexis, Dynastat, Efferalgan, Efferalgan Plus Vitamina C, Efferalgan Vitamina C, Elixure IB, Excedrin Back and Body, Excedrin Migraine, Excedrin PM, Excedrin Sinus Headache, Excedrin Tension Headache, Falcol, Fansamac, Feldene, FeverAll, Fiorinal, Fiorinal con codeína, Flanax, Flector Patch, Flucam, Fortagesic, Gerbin, Glazio, Goody's Back and Body Pain, Goody's Cool Orange, Goody's Extra Strength, Goody's PM, Greaseless Bengay, GW406381, HCT1026, He Xing Yi, Hyanalgese-D, HydrocoDex, Ibuprofeno Sódico PFIZER, Ibuprofeno con, Acetaminofeno PFIZER, Icy Hot SANO Fi AVENTIS, Impracor, Indocin, Indometacina APP PHARMA, Indometacina MYLAN, Tylenol infantil, 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, Ocufer, OMS103HP, Oralease, Orudis ABBOTT JAPAN, Oruvail, Osteluc, OxycoDex, P54, Panadol, Panadol Actifast, Paradine, Paramax, Parfenac, Pedia, 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, Salonas, Saridon, SDX101, Seltouch, sfRowasa, Shinbaro, Sinumax, Sinutab, Sinutab, sinus, Spalt, Sprix, Strefen, Sudafed Cold and Cough, Sudafed Head Cold and Sinus, Sudafed PE Cold plus Cough, Sudafed PE Pressure plus Pain, Sudafed PE, Severe Cold, Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Day en comprimidos, Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Night en comprimidos, Sudafed PE Sinus plus Anti-inflammatory Pain Relief, Sudafed Sinus Advance, Surgam, Synalgos-DC, Synflex, Tavist allergy/sinus/headache, TDS943, TDT070, Theraflu Cold and Sore Throat, Theraflu Daytime Severe Cold and Cough, Theraflu Daytime Warming Relief, Theraflu Warming Relief Caplets Daytime Multi-Symptom Cold, Theraflu Warming Relief Cold and Chest Congestion, Thomapyrin, Thomapyrin C, Thomapyrin efervescente, Thomapyrin Medium, Tilcotil, Tispol, Tolectin, Toradol, TPR100, TQ1011, Trauma-Salbe, Trauma-Salbe Kwizda, Treo, Treximet, Trovex, TT063, Tylenol, Tylenol Allergy Multi-Symptom, Tylenol Back Pain, Tylenol Cold & Cough Daytime, Tylenol Cold & Cough Nighttime, Tylenol Cold and Sinus Daytime, Tylenol Cold and Sinus Nighttime, Tylenol Cold Head Congestion Severe, Tylenol Cold Multi Symptom Daytime, Tylenol Cold Multi Symptom Nighttime Liquid, Tylenol Cold Multi Symptom Severe, Tylenol Cold Non-Drowsiness Formula, Tylenol Cold Severe Congestion Daytime, Tylenol Complete Cold, Cough and Flu Night time, Tylenol Flu Nighttime, Tylenol Menstrual, Tylenol PM, Tylenol Sinus Congestion & Pain Daytime, Tylenol Sinus Congestion & Pain Nighttime, Tylenol Sinus Congestion & Pain Severe, Tylenol Sinus Severe Congestion

Daytime, Tylenol Ultra Relief, Tylenol con cafeína y fosfato de codeína, Tylenol con fosfato de codeína, Ultra Strength Bengay Cream, Ultracet, UR8880, V0498TA01A, Vicks NyQuil Cold and Flu Relief, Vicoprofen, Vimovo, Voltaren Emulgel, Voltaren GEL, Voltaren NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH, Voltaren XR, VT122, Xefo, Xefo Rapid, Xefocam, Xibrom, XL3, Xodol, XP20B, XP21B, XP21L, Zipsor y Zoenasa. En otro aspecto, pueden identificarse inhibidores de 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, el inhibidor de COX-2 se usa para tratar o prevenir o inhibir metástasis en un paciente con cáncer de mama avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se usa en combinación con un segundo tratamiento. En algunos aspectos, el segundo tratamiento es cualquier tratamiento descrito en el presente documento. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se usa en combinación con un segundo tratamiento seleccionado del grupo que consiste en: Denosumab, Zometa (http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&Novald=2935376934467633633; visitado por última vez el 2/12/2012), Carbozantinib o Cabozantinib, anticuerpo o péptido que bloquea la PTHLH (hormona similar a la hormona paratiroidea) o PTHRP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea) y Everolimus.

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

- Inhibidores de la hormona paratiroidea (PTH) y hormona similar a la hormona paratiroidea (PTHL) (incluyendo anticuerpos de bloqueo) o formas recombinantes de los mismos (teriparatida correspondiente a los aminoácidos 7-34 de PTH). Esta hormona actúa estimulando los osteoclastos y aumentando su actividad.

- Ranelato de estroncio: es un tratamiento oral alternativo, y forma parte del grupo de fármacos denominados “agentes óseos de doble acción” (DABA) porque estimulan la proliferación de osteoblastos e inhiben la proliferación de osteoclastos.

- “Moduladores de receptores de estrógeno” (SERM) se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de estrógenos al receptor, independientemente del mecanismo. Ejemplos de moduladores de receptores de estrógeno incluyen, entre otros, estrógenos, progestágeno, estradiol, droloxifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, TSE-424, tamoxifeno, idoxifeno, L Y353381, LY117081, toremifeno, fluevestrant, 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[4-[2-(1-piperidinil)etoxil]fenil]-2H-1-benzopiran-3-il]-fenil-2,2-dimetilpropanoato, 4,4'-dihidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenil-hidrazona y SH646.

- Calcitonina: inhibe directamente la actividad de los osteoclastos a través del receptor de calcitonina. Los receptores de calcitonina se han identificado en la superficie de los osteoclastos.

- Bifosfonatos: son un grupo de medicamentos usados para la prevención y el tratamiento de enfermedades con resorción y reabsorción ósea tal como la osteoporosis y el cáncer con metástasis ósea, siendo este último con o sin hipercalcemia, asociado al cáncer de mama y al cáncer de próstata. Ejemplos de bifosfonatos que pueden usarse en la terapia diseñada por medio del quinto método de la invención incluyen, aunque no limitándose a, bifosfonatos nitrogenados (tales como pamidronato, neridronato, olpadronato, alendronato, ibandronato, risedronato, incadronato, zoledronato o ácido zoledrónico, etc.) y bisfosfonatos no nitrogenados (tales como etidronato, clodronato, tiludronato, etc.).

- “Inhibidores de la catepsina K” se refiere a compuestos que interfieren en la actividad cisteína proteasa de la catepsina K. Los ejemplos no limitativos de inhibidores de la catepsina K incluyen los derivados de 4-amino-pirimidina-2-carbonitrilo (descritos en la solicitud de patente internacional WO 03/020278 con el nombre de Novartis Pharma GMBH), pirrolo-pirimidinas descritas en la publicación WO 03/020721 (Novartis Pharma GMBH) y la publicación WO 04/000843 (ASTRAZENECA AB) así como los inhibidores descritos en las publicaciones PCT WO 00/55126 de Axys Pharmaceuticals, WO 01/49288 de Merck Frosst Canada & Co. y Axys Pharmaceuticals.

- “Inhibidor de DKK-1 (Dickkopf-1)” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto capaz de reducir la actividad de DKK-1. DKK-1 es un antagonista de la ruta de Wnt soluble expresado predominantemente en hueso adulto y regulado positivamente en pacientes con mieloma con lesiones osteolíticas. Los agentes dirigidos a DKK-1 pueden 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, de primera clase. Los estudios preclínicos apoyan la hipótesis de que BHQ880 promueve la formación ósea e inhibe la enfermedad osteolítica inducida por tumores (Ettenberg S. *et al.*, American Association for Cancer Research Annual Meeting. 12-16 de abril de 2008; San Diego, Calif. Resumen).

- “Inhibidor doble de MET y VEGFR2” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que sea un potente inhibidor doble de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape tumoral mediado por MET. MET se expresa no solo en células tumorales y células endoteliales, sino también en osteoblastos (células formadoras de hueso) y osteoclastos (células eliminadoras de hueso). El HGF se une al MET en todos estos tipos de células, lo que da 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 osteoblastos y osteoclastos puede conducir a rasgos patológicos de metástasis óseas, incluyendo crecimiento óseo anómalo (es decir, lesiones blásticas) o destrucción (es decir, lesión lítica). Por tanto, la selección como diana de la ruta de MET puede ser una estrategia viable para prevenir el establecimiento y la progresión de lesiones óseas metastásicas. Cabozantinib (Exelixis, Inc), anteriormente conocido como XL184 (CAS 849217-68-1), es un potente inhibidor doble de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape tumoral mediado por MET. En múltiples estudios preclínicos se ha demostrado que cabozantinib destruye las células tumorales, reduce las metástasis e inhibe la angiogénesis (la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para soportar el crecimiento tumoral). Otros inhibidores dobles adecuados son E7050 (N-[2-fluoro-4-((2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonilaminopiridin-4-il)oxi)fenil]-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida (2R,3R)-tartrato) (CAS 928037-13-2) o Foretinib (también conocido como SK1363089, XL880, CAS 849217-64-7).

- "Inhibidores de RANKL" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto capaz de reducir la actividad de RANKL. RANKL se encuentra en la superficie de la membrana de osteoblastos del estroma y linfocitos T, y estos linfocitos T son los únicos que han demostrado la capacidad de secretarlo. Su función principal es la activación de los osteoclastos, células implicadas en la resorción ósea. Los inhibidores de RANKL pueden actuar bloqueando la unión de RANKL a su receptor (RANK), bloqueando la señalización mediada por RANK o reduciendo la expresión de RANKL mediante el bloqueo de 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 capaz de unirse a RANKL y que comprende la totalidad o un fragmento del dominio extracelular de una proteína RANK. El RANK soluble puede comprender el péptido señal y el dominio extracelular de los polipéptidos RANK murinos o humanos, o alternatively, se puede utilizar la forma madura de la proteína con el péptido señal eliminado.
- Osteoprotegerina o una variante de la misma con capacidad de unión a RANKL.
- Moléculas antisentido específicas de RANKL.
- Ribozimas capaces de procesar los productos transcritos de RANKL
- Anticuerpos anti-RANKL específicos. "Anticuerpo anti-RANKL o anticuerpo dirigido contra RANKL" se entiende en el presente documento como todo aquel anticuerpo capaz de unirse específicamente al ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) inhibiendo una o más funciones de RANKL. Los anticuerpos se pueden preparar usando cualquiera de los métodos conocidos por el experto en la técnica. Por tanto, los anticuerpos policlonales se preparan por medio de la inmunización de un animal con la proteína a inhibir. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Kohler, Milstein *et al.* (Nature, 1975, 256: 495). Los anticuerpos adecuados en el contexto de la presente invención incluyen anticuerpos intactos que comprenden una región variable de unión a antígeno y una región constante, fragmentos "Fab", "F(ab')₂" y "Fab", Fv, scFv, diacuerpos y anticuerpos biespecíficos.
- Nanocuerpos anti-RANKL específicos. Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural. La tecnología de nanocuerpos se desarrolló originalmente tras el 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

donde FR1 a FR4 son las regiones de entramado 1 a 4, CDR1 a CDR3 son las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un dominio variable único (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). De manera importante, el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga la capacidad de unión a antígeno completa del anticuerpo original de cadena pesada. 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 nanocuerpos.

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 el Denosumab (Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3): 210-215, número CAS 615258-40-7). Denosumab es un anticuerpo monoclonal totalmente humano que se une a RANKL y previene 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 epitopo que Denosumab.

En una realización preferida, el nanocuerpo anti-RANKL es cualquiera de los nanocuerpos descritos en el documento

WO2008142164. En una realización aún más preferida, el anticuerpo anti-RANKL es el ALX-0141 (Ablynx). ALX-0141 se ha diseñado para inhibir la pérdida ósea asociada con osteoporosis posmenopáusica, artritis reumatoide, cáncer y ciertos medicamentos, y para restaurar el equilibrio del metabolismo del hueso 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, inhibidor de PTH y PTHLH o un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor doble de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógeno, radio-223, calcitonina y un inhibidor de 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 una realización, se administra un antagonista de CCR5 para prevenir o inhibir metástasis del tumor de cáncer de mama primario al hueso. En una realización, el antagonista de CCR5 es una molécula grande. En otra realización, el antagonista de CCR5 es una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el antagonista de CCR5 es Maraviroc (Velasco-Velázquez, M. *et al.* 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 72:3839-3850). En algunas realizaciones, el antagonista de CCR5 es Vicriviroc. Velasco-Velázquez, M. *et al.* 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 72:3839-3850). En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es Aplaviroc (Demarest J.F. *et al.* 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. *Retrovirology* 2(Supl. 1): S13). En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es un antagonista de CCR5 espiropiperidina. (Rotstein D.M. *et al.* 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19 (18): 5401-5406. En algunas realizaciones, el antagonista de CCR5 es INCB009471 (Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 4(2): 82-7).

En una realización preferida el inhibidor doble de MET y VEGFR2 se selecciona del grupo que consiste en Cabozantinib, Foretinib y E7050.

En una realización preferida la terapia de radio 223 es Alpharadin.

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

Métodos para el tratamiento de metástasis óseas de cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) usando agentes inhibidores de c-MAF

En otro aspecto, la invención se refiere a un agente inhibidor de c-MAF (en lo sucesivo, agente inhibidor de la invención) para uso en el tratamiento o la prevención de metástasis ósea de cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal).

En otro aspecto, la invención se refiere a la utilización de un agente inhibidor de c-MAF para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de metástasis ósea de cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal).

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento o la prevención de metástasis ósea de cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) en un sujeto que lo necesita que comprende la administración a dicho sujeto de un agente inhibidor de c-MAF.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para prevenir o reducir el riesgo de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto un agente que previene o reduce la metástasis ósea, en el que dicho agente se administra de acuerdo con un régimen de tratamiento determinado a partir de cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en dicho sujeto.

A modo de ilustración no limitativa, agentes inhibidores de c-MAF adecuados para uso en la presente invención incluyen oligonucleótidos antisentido, ARN de interferencia (ARNip), ARN catalíticos, ribozimas, anticuerpos inhibidores o nanocuerpos, una variante dominante negativa de c-MAF o un compuesto de la tabla 1 o 2.

Oligonucleótidos antisentido

Un aspecto adicional de la invención 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 va a inhibirse. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden unir a la diana potencial del medicamento mediante complementariedad de bases convencional o, por ejemplo, en el caso de unirse a ADN bicatenario, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. En general, estos métodos se refieren a una gama de técnicas generalmente empleadas en la técnica e incluyen cualquier método que se basa en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

Un constructo antisentido de la presente invención se puede distribuir, por ejemplo, como un plásmido de expresión

que, cuando se transcribe en una célula, produce ARN que es complementario a al menos una parte única del ARNm celular que codifica para c-MAF. De forma alternativa, el constructo antisentido es una sonda de oligonucleótido que se genera *ex vivo* y que, cuando se introduce en la célula, produce inhibición de la expresión génica hibridándose con el ARNm y/o secuencias genómicas de un ácido nucleico diana. Tales sondas de oligonucleótido son preferiblemente oligonucleótidos modificados, que son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y que son por lo tanto estables *in vivo*. 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 5176996; 5264564; y 5256775). Adicionalmente, se han revisado las aproximaciones generales para construir oligómeros útiles en la terapia antisentido, por ejemplo, en Van der Krol *et al.*, *BioTechniques* 6: 958-976, 1988; y Stein *et al.*, *Cáncer Res* 48: 2659-2668, 1988.

Respecto al oligonucleótido antisentido, se prefieren las regiones de oligodesoxirribonucleótidos derivadas del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre -10 y +10 del gen diana. Las aproximaciones antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (o bien ADN o bien ARN) que son complementarios al ARNm que codifica para el polipéptido diana. Los oligonucleótidos antisentido se unirán al ARNm transcrito e impedirán la traducción.

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

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

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser ADN o ARN mono o bicatenario o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos. El oligonucleótido se puede modificar en el grupo de la base, el grupo del azúcar o el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a los receptores de las células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular (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; publicación PCT n.º WO88/09810) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO89/10134), agentes intercalantes (véase, por ejemplo, Zon, *Pharm. Res.* 5: 539-549, 1988). Para este fin, el oligonucleótido puede estar conjugado a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente transportador, agente de corte desencadenado por hibridación, etc.

Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos un grupo de base modificada. El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un grupo azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye pero no está limitado a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa. El oligonucleótido antisentido también puede contener un esqueleto semejante a un péptido neutro. Tales 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.

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

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

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

De forma alternativa, se puede reducir la expresión del gen diana dirigiendo secuencias de desoxirribonucleótidos

complementarias a la región reguladora del gen (es decir, el promotor y/o potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que previenen la transcripción génica en las células diana en el cuerpo (véanse en general, Helene, *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569-84, 1991). En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido son morfolinis antisentido.

5

ARNip

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

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

20

- ARNip en los que los enlaces entre los nucleótidos son distintos de los que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces fosforotioato.

25

- Conjugados de la hebra de ARN con un reactivo funcional, tal como un fluoróforo.

- Modificaciones de los extremos de las hebras de ARN, en particular el extremo 3' mediante la modificación con distintos grupos funcionales hidroxilo en posición 2'.

30

- Nucleótidos con azúcares modificados tales como residuos O-alquilados en posición 2' tales como 2'-O-metilribosa o 2'-O-fluororibosa.

- Nucleótidos con bases modificadas tales como bases halógenadas (por ejemplo 5-bromouracilo y 5-yodouracilo), bases alquiladas (por ejemplo 7-metilguanosina).

Los ARNip pueden usarse como tales, es decir, en forma de un ARN bicatenario con las características anteriormente mencionadas. Alternativamente, es posible el uso de vectores que contienen las secuencias de las hebras sentido y antisentido de los ARNip bajo el control de promotores adecuados para su expresión en la célula de interés.

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

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

Promotores adecuados para su uso en la expresión de ARNip a partir de vectores de expresión convergente o divergente incluyen cualquier promotor o pareja de promotores compatible con las células en las que se desea expresar los ARNip. Así, promotores adecuados para la presente invención incluyen, sin limitarse 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 la 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 que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o de una señal exógena, tales como el sistema de tetraciclina, el sistema de NFkappaB/luz UV, el sistema de Cre/Lox y el promotor de los genes de choque térmico,

los promotores regulables de la ARN polimerasa II descritos en el documento WO/2006/135436 así como promotores específicos de tejido ((por ejemplo, el promotor de PSA descrito en el documento WO2006012221). En una realización preferida, los promotores son promotores de la ARN polimerasa III que actúan de forma constitutiva. Los promotores de la ARN polimerasa III aparecen en un número limitado de genes tales como ARN 5S, ARNt, ARN 7SL y ARNsn U6.

A diferencia de otros promotores de la ARN polimerasa III, los promotores de tipo III no requieren ninguna secuencia intragénica si no que necesitan más bien secuencias en dirección 5' que comprenden una caja TATA en posiciones -34 y -24, un elemento proximal de secuencia o PSE entre -66 y -47 y, en algunos casos, un elemento distal de secuencia 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 de origen humano o murino. En una forma de realización aún más preferida, los promotores son 2 promotores U6 de origen humano o murino, un promotor U6 de ratón y un promotor H1 humano o un promotor U6 humano y un promotor H1 de ratón. En el contexto de la presente invención, promotores especialmente adecuados y por lo tanto, especialmente preferidos para expresar de forma específica genes de interés en tumores de mama, preferiblemente, en tumores de mama triple negativos (incluyendo de tipo basal), son los promotores del gen ER alfa o del gen ciclina D1.

Los ARNip pueden generarse intracelularmente a partir de los denominados ARNhp, caracterizados por que las hebras antiparalelas que forman el ARNip están conectadas por una región de bucle u horquilla. Los ARNhp pueden estar codificados por plásmidos o virus, particularmente retrovirus y estar bajo el control de un promotor. Promotores adecuados para la expresión de ARNhp son los indicados en el párrafo anterior para la expresión de ARNip.

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

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

ARNip específicos para c-MAF incluyen el ARNip descrito en el documento WO2005046731, una de cuyas hebras es ACGGCUCGAGCAGCGACAA (SEQ ID NO: 6). Otras secuencias de ARNip específicas para c-MAF incluyen, sin limitación, CUUACGAGUGUGUUCACAA (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, la invención también contempla el uso de enzimas de ADN para inhibir la expresión del gen c-MAF de la invención. Las enzimas de ADN incorporan algunas de las características mecánicas tanto de las tecnologías antisentido como de las de ribozimas. Las enzimas de ADN se diseñan de modo que reconozcan una secuencia diana de ácido nucleico particular, similar al oligonucleótido antisentido, sin embargo, como la ribozima son catalíticas y cortan específicamente el ácido nucleico diana.

Ribozimas

También pueden diseñarse moléculas de ribozimas diseñadas para cortar de forma catalítica productos de transcripción de un ARNm diana para prevenir la traducción del ARNm que codifica para c-MAF cuya actividad va a inhibirse. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar el corte específico de ARN (Para una revisión, véase Rossi, Current Biology 4: 469-471, 1994). El mecanismo de acción de la ribozima implica hibridación específica de una secuencia de molécula de ribozima con un ARN diana complementario, seguido por un suceso de corte endonucleolítico. La composición de las moléculas de ribozima incluye preferiblemente una o más secuencias complementarias al ARNm diana, y la bien conocida secuencia responsable del corte del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5093246).

Las ribozimas usadas en la presente invención incluyen las ribozimas de cabeza de martillo, la ARN

endorribonucleasas (de aquí en adelante “ribozimas de tipo Cech”) (Zaug *et al.*, Science 224:574-578, 1984).

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

Anticuerpos inhibidores

Por “anticuerpo inhibidor” se entiende en el contexto de la presente invención todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse a la proteína c-MAF de manera específica e inhibir una o más de las funciones de dicha proteína, preferiblemente las relacionadas con la transcripción. Los anticuerpos pueden prepararse usando cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la técnica, algunos de los cuales se han mencionado anteriormente. Así, los anticuerpos policlonales se preparan mediante 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). Anticuerpos adecuados en el contexto de la presente invención incluyen anticuerpos intactos que comprenden una región variable de unión a antígeno y una región constante, fragmentos “Fab”, “F(ab')₂” y “Fab”, Fv, scFv, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos, alfacuerpos, ciclopéptidos y péptidos grapados. Una vez identificados anticuerpos con capacidad de unión a la proteína c-MAF, se seleccionarán aquellos capaces de inhibir la actividad de esta proteína usando un ensayo de identificación de agentes inhibidores.

Péptidos inhibidores

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

Dominantes negativos de c-MAF

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

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

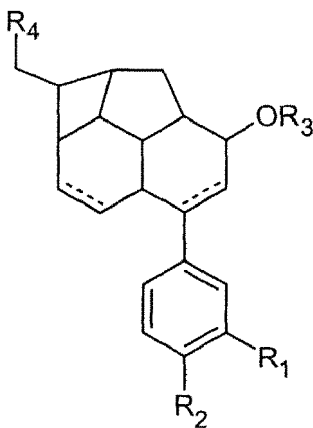
La invención contempla el uso tanto de las variantes dominantes negativas de c-MAF como de los polinucleótidos que codifican para c-MAF bajo el control operativo de un promotor adecuado para la expresión en la célula diana. Los promotores que pueden usarse para regular la transcripción del polinucleótido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

Preferiblemente, los promotores inducibles que pueden usarse en el contexto de la presente invención son aquellos que responden a un agente inductor mostrando una expresión basal nula o despreciable en ausencia de agente

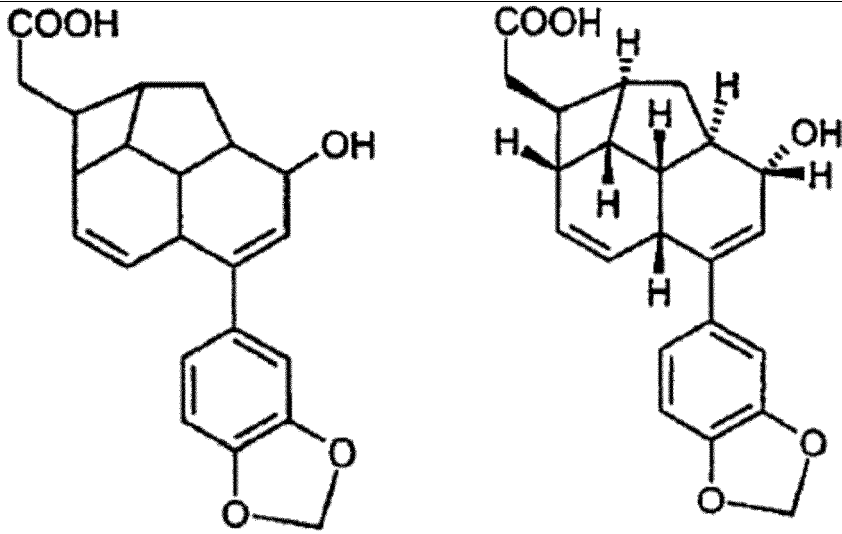
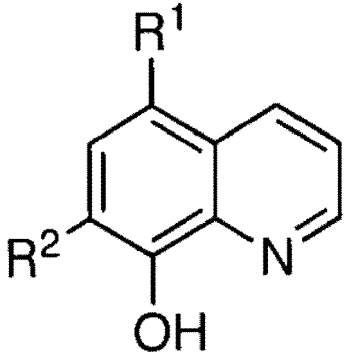
- inductor y que son capaces de promover la activación del gen localizado en posición 3'. En función del tipo de agente inductor, los promotores inducibles se clasifican en promotores Tet on/off (Gossen, M. y H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551; Gossen, M. *et al.*, 1995, Science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

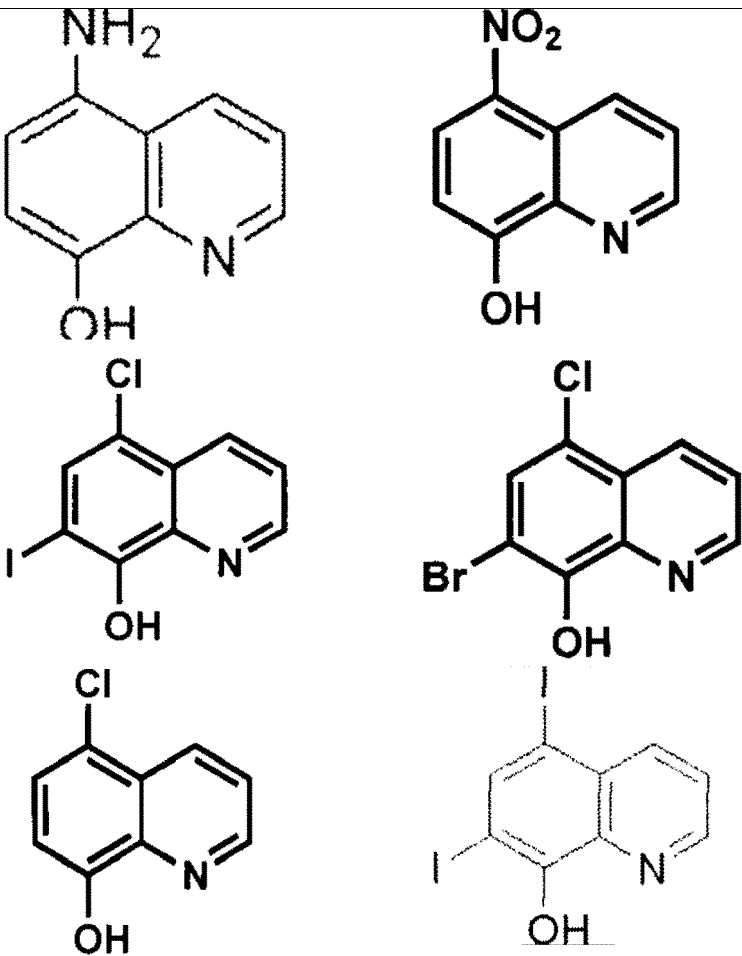
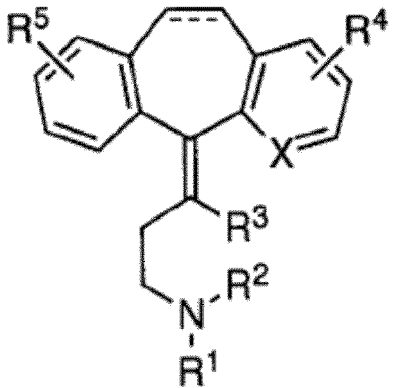
Moléculas pequeñas

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

25	I Derivados del ácido endiátrico H tales como los descritos en el documento WO2008014888 y que corresponden a la fórmula general  donde R₁ y R₂ son, independientemente el uno del otro, 1.0 H o 2.0 un grupo -O-alquilo C₁-C₆, -O-alquenilo C₂-C₆, -O-alquinilo C₂-C₆ u -O-arilo C₆-C₁₀, en el cual alquilo, alquenilo y alquinilo son de cadena lineal o ramificados, y en el que los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo están mono- o disustituidos con: 2.1 -OH, 2.2 =O, 2.3 -O-alquilo C₁-C₆, en el cual alquilo es de cadena lineal o ramificado, 2.4 -O-alquenilo C₂-C₆, en el cual alquenilo es de cadena lineal o ramificado, 2.5 -arilo C₆-C₁₀, 2.6 -NH-alquilo C₁-C₆, en el cual alquilo es de cadena lineal o ramificado,
----	---

	2.7 -NH-alquenilo C₂-C₆, en el cual alquenilo es de cadena lineal o ramificado, 2.8 -NH₂ o 2.9 halógeno, y en el que el grupo arilo, eventualmente está mono- o disustituido con el sustituyente 2.1 o 2.3 a 2.9, en el cual los sustituyentes 2.3, 2.4, 2.6 y 2.7 pueden estar sustituidos adicionalmente con funciones -CN, -amida u -oxima, y 2.5 puede estar sustituido adicionalmente con funciones -CN o amida, o R₁ y R₂ juntos forman un anillo, en donde R₁ y R₂ significan un grupo -O-[alquilen (C₁-C₆)]-O-, R₃ es 1.0 H o 2.0 un grupo -O-alquilo C₁-C₆, -O-alquenilo C₂-C₆, -O-alquinilo C₂-C₆ u -O-arilo C₆-C₁₀, en el cual alquilo, alquenilo y alquinilo son de cadena lineal o ramificados, y en el que los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo están mono- o disustituidos con: 2.1 -OH, 2.2 =O, 2.3 -O-alquilo C₁-C₆, en el cual alquilo es de cadena lineal o ramificado, 2.4 -O-alquenilo C₂-C₆, en el cual alquenilo es de cadena lineal o ramificado, 2.5 -arilo C₆-C₁₀, 2.6 -NH-alquilo C₁-C₆, en el cual alquilo es de cadena lineal o ramificado, 2.7 -NH-alquenilo C₂-C₆, en el cual alquenilo es de cadena lineal o ramificado, 2.8 -NH₂ o 2.9 halógeno, y en el que el grupo arilo, eventualmente está mono- o disustituido con el sustituyente 2.1 o 2.3 a 2.9, en el cual los sustituyentes 2.3, 2.4, 2.6 y 2.7 pueden estar sustituidos adicionalmente con funciones -CN, -amida u -oxima, y 2.5 puede estar sustituido adicionalmente con funciones -CN o amida R₄ es CO₂R₃, CO₂NHR₃, CHO, CH₂OR₃, CH₂OSi(R₃)₃, CH₂Br, CH₂CN, en los cuales R₃ es tal como se ha definido anteriormente y, en particular, los compuestos
--	---

	
II	Derivados de 8-hidroxiquinolina tales como los descritos en el documento WO2009146546 de fórmula general  donde R₁ se selecciona del grupo de NO₂, NH₂, NH(alquilo C₁₋₆) y N(alquilo C₁₋₆)(alquilo C₁₋₆); R₂ se selecciona de H, halógeno, alquilo C₁₋₆ y alquilo C₁₋₆ sustituido con flúor, o R₁ es Cl y R₂ es Br o H, y, preferiblemente, los compuestos

	
III	Clioquinol (5-cloro-7-yodoquinolin-8-ol) tal y como se describe en el documento WO09049410
IV	Compuestos tales como los descritos en el documento WO08098351 de fórmula general  donde ==-:-:- es un enlace sencillo o doble, R¹ se selecciona del grupo de H, alquilo C₁-C₄, C(O)O-alquilo C₁-C₄, C(O)-alquilo C₁-C₄ y C(O)NH-alquilo C₁-C₄; R² se selecciona de H y alquilo C₁-C₄; R³ se selecciona de H y alquilo C₁-C₄; o R² y R³ se encuentran unidos junto con el átomo de carbono y de nitrógeno al que se encuentran unidos para formar un anillo de piperidina,

	R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de H, halógeno, hidroxilo, alquilo C₁-C₄, alquilo C₁-C₄ sustituido con flúor y alcoxi C₁-C₄; y X se selecciona de C y N. y compuestos preferidos tales como Ciproheptadina (clorhidrato de 4-(5H-dibenzo[a,d]cicloheptan-5-ilideno)-1-metilpiperidina) Amitriptilina (3-(10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5-ilideno)-N,N-dimetil-1-propanamina) Loratadina (4-(8-cloro-S,6-dihidro-11H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridin-11-ilidina)-1-)piperidincarboxilato de etilo Ciclobenzapina (3-(5H-dibenzo[a,d]cicloheptan-5-ilideno)-N,N-dimetil-1-propanamina)
V	Nivalenol (12,13-epoxi-3,4,7,15-tetrahidroxitricotec-9-en-8-ona) tal como se describe en el documento WO0359249

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

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

5

Tabla 2: Inhibidores de c-MAF

Antagonista	Referencia para actividad inhibidora de cdk2
Análogos de purina	
Purvalanoles tales como 2-(1R-isopropil-2-hidroxietilamino)-6-(3-cloroanilino)-9-isopropilpurina que tiene una fórmula molecular C ₁₉ H ₂₅ ClN ₆ O disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial Purvalanol A (# P4484, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), Purvalanol B, aminopurvalanol, compuesto 52 (donde el isopropilo de purvalanol A se sustituye por H)	Gray, N.S. <i>et al.</i> , Science, 281, 533-538 (1998); Chang, Y.T. <i>et al.</i> , Chem. Biol., 6, 361-375 (1999).
2-(Hidroxietilamino)-6-bencilamino-9-metilpurina que tiene una fórmula molecular C ₁₅ H ₁₈ N ₆ O disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial Olomoucine (#O0886), 2-(2'-hidroxietilamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina que tiene una fórmula molecular C ₁₇ H ₂₂ N ₆ O disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial N'-isopropilolomoucina (#10763); CVT-313	Vesely, J., <i>et al.</i> (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86, 11; Brooks, E.E., <i>et al.</i> , (1997) J. Biol. Chem., 272, 29207-11
6-(Bencilamino)-2(R)-[[1-(hidroximetil)propil]amino]-9-isopropilpurina 2-(R)-[[9-(1-metiletil)-6-[(fenilmetil)amino]-9H-purin-2-il]amino]-1-butanol que tiene una fórmula molecular de C ₁₉ H ₂₆ N ₆ O disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial de Roscovitine (# R7772), metoxiroscovitina	Wang, D. <i>et al.</i> , J. Virol., 75, 7266-7279 (2001); McClue, S.J. <i>et al.</i> , Int. J. Cancer, 102, 463-468 (2002); Meijer, L., <i>et al.</i> , (1997) Eur. J. Biochem., 243, 527-36
El análogo de purina N2-(cis-2-aminociclohexil)-N6-(3-clorofenil)-9-etil-9H-purina-2,6-diamina que tiene una fórmula molecular de C ₁₉ H ₂₄ ClN ₇ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial CGP74514 (#C3353)	Imbach, P. <i>et al.</i> , Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).
CGP79807, un análogo de purina de CGP74514 (visto anteriormente) donde Cl se sustituye por CN, se elimina OH y la posición orto del anillo de ciclohexano es NH ₂	Imbach, P. <i>et al.</i> , Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).
Análogo de purina tal como O6-ciclohexilmetilguanina NU2058	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
Análogo de purina tal como NU6102	Arris, C.E. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000); Davies, T.G. <i>et al.</i> , Nat. Struct Biol., 9, 745-749 (2002).

Isopentenil-adenina	Vesely, J., <i>et al.</i> , (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86
Agentes no basados en purina	
Indirrubinas tales como indirubin-3'-monoxima que tienen una fórmula molecular de $C_{16}H_{11}N_3O_2$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial (#I0404), 5-sulfonato de indirubina, 5-cloroindirubina	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.
Oxindol 1 de Fischer como se hace referencia en la columna 2 de esta tabla, (#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 tiazol fusionado, 4-[[[(7-oxo-6,7-dihidro-8H-[1,3]tiazolo[5,4-e]indol-8-ilideno)metil]amino)-N-(2-piridil)benzenosulfonamida que tiene una fórmula molecular de $C_{21}H_{15}N_5O_3S_2$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial GW8510 (#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, National Cancer Institute, Bethesda, MD) y un derivado de decloro	Carlson, B.A., <i>et al.</i> , (1996) Cancer Res., 56, 2973-8
Alcaloides tales como estaurosporina (#S1016, A.G. Scientific, San Diego, CA) o UCN-01 (7-hidroxiestaurosporina) National Cancer Institute, Bethesda, MD	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]benzacepin-6(5H)-ona que tiene una fórmula molecular de $C_{16}H_{11}BrN_2O$ disponible de Sigma-Aldrich bajo el nombre comercial de kenpaullone (#K3888), o 9-nitro-7,12-dihidroindolo-[3,2-d][1]benzacepin-6(5)-ona que tiene una fórmula molecular de $C_{16}H_{11}N_3O_3$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial de alsterpaullone (#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
Himenialdisinas tales como 10z-himenialdisina que tiene una fórmula molecular de $C_{11}H_{10}BrN_5O_2$ disponible de Biochemicals.net, una división de A.G. Scientific, Inc. (San Diego, CA) (H-1150)	Meijer, L., <i>et al.</i> , (1999) 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; WO95/09853, Zimmermann <i>et al.</i> , 21 de septiembre de 1994
Tiazolopirimidina 2	Attaby <i>et al.</i> , Z. Naturforsch. 54b, 788-798 (1999)
Diarylurea	Honma, T. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 44,4628-4640 (2001), Honma, T. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 44, 4615-4627 (2001).
Éster metílico del ácido (2R)-2,5-dihidro-4-hidroxi-2-[(4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)fenil)metil]-3-(4-hidroxifenil)-5-oxo-2-furancarboxílico que tiene una fórmula molecular de $C_{24}H_{24}O_7$ disponible de Sigma-Aldrich con la marca comercial Butyrolactone-I (B7930)	Kitagawa, M. <i>et al.</i> , Oncogene, 8,2425-2432 (1993).
Aloisine A, n.º de cat., 128125 (Calbiochem, San Diego, CA)	Mettey <i>et al.</i> , J. Med. Chem. 2003, 46, 222-236

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

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

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

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

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

En el caso de que se administren ácidos nucleicos (ARNip, polinucleótidos que codifican para ARNip o ARNhp o polinucleótidos que codifican para dominantes negativos de c-MAF), la invención contempla composiciones farmacéuticas especialmente preparadas para la administración de dichos ácidos nucleicos. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender dichos ácidos nucleicos desnudos, es decir, en ausencia de compuestos que protejan a los ácidos nucleicos de su degradación por las nucleasas del organismo, lo que conlleva la ventaja de que se elimina la toxicidad asociada a los reactivos usados para la transfección. Vías de administración adecuadas para los compuestos desnudos incluyen la vía intravascular, intratumoral, intracraneal, intraperitoneal, intraesplénica, intramuscular, subretiniana, subcutánea, mucosa, tópica y oral (Templeton, 2002, DNA Cell Biol., 21:857-867). Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden administrarse formando parte de liposomas, conjugados a colesterol o conjugados a compuestos capaces de promover la translocación a través de membranas celulares tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simple, oligómeros de arginina y péptidos tales como los 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 de un vector viral, preferiblemente vectores basados en adenovirus, en virus adenoasociados o en retrovirus, tales como virus basados en el virus de la leucemia murina (MLV) o en lentivirus (HIV, FIV, EIAV).

Los agentes inhibidores de c-MAF o las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden administrarse en dosis de menos de 10 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente menos de 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005,

0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005 o 0,00001 mg por cada kg de peso corporal. La dosis unitaria se puede administrar por inyección, por inhalación o por administración tópica.

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

Tratamiento o prevención de la degradación del hueso en pacientes con cáncer de mama con metástasis ósea que tiene elevados niveles de c-MAF

En otro aspecto, la invención se refiere a un agente inhibidor de c-MAF o un agente capaz de evitar o prevenir la degradación de hueso para su uso en el tratamiento de la metástasis ósea en un paciente que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) y que tiene elevados niveles de c-MAF en una muestra de metástasis con respecto a una muestra de control.

En otro aspecto, la invención se refiere a la utilización de un agente inhibidor de c-MAF o un agente capaz de evitar o prevenir la degradación de hueso para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) y que tiene elevados niveles de c-MAF en una muestra de metástasis con respecto a una muestra de control.

Alternativamente, la invención se refiere a un método de prevención y/o tratamiento de la degradación en un paciente que padece cáncer de mama y tiene elevados niveles de c-MAF en una muestra de metástasis con respecto a una muestra de control, que comprende administrar un agente inhibidor de c-MAF o un agente para evitar o impedir la degradación del hueso en dicho sujeto.

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

Agentes inhibidores de c-MAF y agentes capaces de evitar o prevenir la degradación ósea adecuados para el método terapéutico descrito en la presente invención se han descrito en detalle anteriormente en el contexto del método de terapia personalizada.

La muestra de referencia o control es una muestra de un sujeto con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) que no ha padecido metástasis o que corresponden al valor de la mediana de los niveles de expresión del gen c-MAF medida en una colección de muestras de tejido tumoral de muestras de biopsias de pacientes con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) que no han padecido metástasis.

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

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

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

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

Kits

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un kit para predecir las metástasis óseas de un cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), en un sujeto que padece dicho cáncer, comprendiendo el kit: a) medios para cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en una muestra de dicho sujeto, y b) medios para comparar el nivel

cuantificado de expresión de c-MAF en dicha muestra con un nivel de referencia de expresión de c-MAF.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un kit para la predicción del resultado clínico de un sujeto que padece metástasis ósea de un cáncer de mama triple negativo o de tipo basal, comprendiendo el kit: a) medios para cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en una muestra de dicho sujeto, y b) medios para comparar el nivel de expresión cuantificado de c-MAF en dicha muestra con un nivel de referencia de expresión de c-MAF.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un kit para determinar una terapia para un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), comprendiendo el kit: a) medios para cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en una muestra de dicho sujeto, b) medios para comparar el nivel de expresión cuantificado de c-MAF en dicha muestra con un nivel de expresión de referencia de c-MAF, 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.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un kit que comprende: i) un reactivo para cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en una muestra de un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), y ii) uno o más índices del nivel de expresión génica de c-MAF que se han predeterminado para correlacionarse con el riesgo de metástasis ósea.

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

En una realización preferida de la divulgación, los medios para cuantificar la expresión comprenden un conjunto de sondas y/o cebadores que se unen específicamente y/o amplifican el gen c-MAF.

En una realización particular de la divulgación, el cáncer de mama es cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) o ER+ (incluyendo luminal A y B).

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

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

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

a) proporcionar una muestra de dicho sujeto;

b) cuantificar el nivel de expresión de c-MAF en dicha muestra;

c) tipificar dicha muestra comparando el nivel de expresión cuantificado de c-MAF con un nivel de referencia predeterminado de la expresión de c-MAF;

en donde dicha tipificación proporciona información pronóstica en relación con el riesgo de metástasis ósea en dicho sujeto.

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

En una realización particular, el cáncer de mama es cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) o ER+ (incluyendo luminal A y B).

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

Método para clasificar a un sujeto que padece cáncer de mama.

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

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

En una realización particular, el cáncer de mama es cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) o ER+ (incluyendo luminal A y B).

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

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

En otra realización preferida, dicho nivel de expresión de c-MAF en dicha muestra está incrementado con respecto a dicho nivel de referencia predeterminado, y en donde los miembros de la cohorte se clasifican como que presentan elevado riesgo de metástasis ósea. En otra realización preferida, dicha cohorte es para llevar a cabo un ensayo clínico.
10 En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

Ejemplos

Cohorte I. Cohorte de tumor primario de cáncer de mama de descubrimiento

15 Se clasificaron tumores humanos de mama en 5 subtipos tal como se describen en el Clasificador Intrínseco de Cáncer de Mama PAM50 y luego se realizó el análisis estadístico apropiado para ver si la expresión de c-MAF (MAF) en estos tumores se correlaciona con casos de metástasis ósea en algunos de los subtipos propuestos. PAM50 tiene un subtipo llamado de tipo basal. Se utilizó el grupo triple negativo en su lugar. La información de los pacientes se ha descargado de GEO (T. Barrett (T. Barrett, D. B. Troup, S. E. Wilhite, P. Ledoux, D. Rudnev, C. Evangelista, I. F. Kim, A. Soboleva, M. Tomashevsky, y R. Edgar. NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles-database and tools update. Nucleic Acids Research, 35, enero de 2007. ISSN 1362-4962)). Se utilizó el siguiente conjunto de datos: unión de GSE2603, GSE2034 y GSE12276. Esta cohorte de unión tenía 560 pacientes. Con el fin de eliminar los sesgos sistemáticos, antes de la fusión las mediciones de expresión para todos los genes se convirtieron en puntuaciones z.
20 Todos los análisis estadísticos se realizaron con Bioconductor ((R.C. Gentleman, V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, oS. Du-doit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A.J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J.Y.H. Yang, y J. Zhang. Bioconductor: Open software development for computa-tional biology and bioinformatics. Genome Biology, 5:R80, 2004. URL <http://genomebiology.com/2004/5/10/R80>)).

Cohorte II. Cohorte de muestra de tumor primario de cáncer de mama de validación:

Se utilizó una segunda cohorte de tumor de mama humano para validar la hipótesis descubierta con la cohorte I de muestra de tumor del paciente anterior. El conjunto de validación independiente está compuesto por más de 380
35 muestras de cáncer de mama primario de pacientes con estadio de BC I, II o III y seguimiento anotado (Rojo F., Ann Oncol (2012) 23 (5): 1156-1164). Los microalineamientos tisulares se procesaron según los procedimientos estándar. Los tumores se clasificaron en 3 subtipos según ER+, triple negativo y HER2+ y luego se realizaron los análisis estadísticos apropiados para ver si la expresión de c-MAF (MAF) y la amplificación de 16q22-24 en estos tumores se correlacionan con casos de metástasis ósea en algunos de los subtipos dados.

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

i) Comparación de características iniciales (tabla 3 y 6).

45 La igualdad de varianzas de edad se somete a prueba con la prueba de F de veces. Las diferencias en la media de edad se someten a prueba con la prueba de la t de Satterhwaite o combinada (ANOVA o Kruskal-Wallis para la comparación de categorías múltiples) dependiendo de la igualdad de varianzas. Las variables categóricas se comparan con una prueba de chi cuadrado o Fisher cuando sea aplicable.

50 ii) Rendimiento diagnóstico de FISH e IHC

- El análisis multivariante se realiza mediante selección por etapas con un criterio de valor de p para introducir la variable de $p < 0.2$ y un criterio para retener la variable en el modelo después del ajuste de $p < 0.10$. El rendimiento diagnóstico se evaluará comparando el AUC de las curvas ROC. La bondad de ajuste del modelo se evaluará con la
55 prueba de Hosmer-Lemeshow (si es significativa, no se realizará ningún análisis adicional).

- Se calculará la sensibilidad (Se), especificidad (Sp), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para cada de las categorías de clasificación basándose en las variables más predictivas (16q23 FISH y MAF IHC). Para superar el problema de sobreajuste de datos, se realizará el muestreo con reposición de VPP y VPN.

60 iii) Función pronóstica

- Se realizará el modelado de regresión de Cox del tiempo de desenlace hasta metástasis ósea, con un manejo "efron" de los lazos. El número de casos conducirá al número de variables que se introducen en los modelos
65 (aproximadamente una variable para cada 5-10 casos).

- La suposición de riesgo proporcional se comprobará usando la prueba suprema para la suposición de riesgos proporcionales tal como se implementa en SAS 9.3. Esta prueba produce un valor de p significativo si se infringe esta suposición.

5 Clasificación de los subtipos de cáncer de mama

Los genes PAM50 de la cohorte de unión (cohorte I de descubrimiento) se normalizaron de acuerdo a los genes descritos como genes control en la firma genética PAM50. Para cada paciente, las estimaciones de expresión se normalizaron restando la media de los genes control para el mismo paciente.

Se calcularon 5 puntuaciones para clasificar a los pacientes:

- Estado de ESR1: La distribución del gen ESR1 mostró bimodalidad (figura 1). Los dos modos identifican a los pacientes con alto ESR1 y bajo ESR1. Se utilizó el paquete “mclust” para ajustarse a una mezcla de distribuciones normales con 2 componentes y obtener la probabilidad posterior de que cada paciente pertenezca al componente ESR1 alto y bajo. Se consideró un paciente ESR1 bajo si la probabilidad a posteriori de pertenecer a este grupo era más grande que el 80%. El mismo criterio se utilizó para ESR1 alto. Cuando un paciente no era ni ESR1 alto ni ESR1 bajo se consideró ESR1 intermedio.
- Estado luminal: Se calculó una puntuación luminal para cada paciente calculando el promedio de la expresión de todos los genes en la lista de genes luminales. La distribución de la puntuación luminal mostró bimodalidad (figura 1), por lo tanto, se describe el estado luminal de la misma manera que el estado de ESR1.
- Estado de proliferación: Para cada paciente se calculó una puntuación de proliferación calculando el promedio de la expresión de todos los genes en la lista de genes luminales. Las medias de genes de proliferación no mostraron bimodalidad (figura 1). Por lo tanto, la mitad de los pacientes con valores medios más bajos se consideraron con proliferación baja. El resto se consideró con proliferación alta.
- Estado de PGR1: El gen PGR1 muestra bimodalidad (figura 1), por lo tanto, se describió el estado de PGR1 de la misma manera que el estado luminal.
- Estado de erbB2: El gen ErbB2 no muestra bimodalidad (figura 1). Una muestra se describe como ErbB2 alta cuando el valor de expresión de ErbB2 es superior a la media de ErbB2 más una desviación estándar de ErbB2. De lo contrario la muestra se considera ErbB2 baja.

Dos genes luminales y uno de proliferación no existían en la cohorte de unión. No se usaron. Cada paciente se asignó a un subtipo de acuerdo a PAM50.

Hubo 58 pacientes que no pudieron asignarse a ninguno de los subtipos de acuerdo a la clasificación de PAM50. No se encontraron pacientes que pertenecieran a más de un subtipo.

Los tumores positivos para receptor de estrógeno (ER+) se definen como ESR1 alto.

Los tumores triple negativos se definen como ESR1, PGR1 y ERBB2 bajo.

Para la validación de la cohorte II, la clasificación de pacientes se basó en la puntuación de rutinaria por un patólogo según fines diagnósticos. Los tumores ER+ se definieron como tumores que expresan ESR1, tumores de cáncer de mama triple negativo se definieron como tumores que no expresan ESR1, PR y HER2. Los tumores HER2+ se definieron como tumores HER2 2+ y 3+ según puntuación por patólogo. Hubo 6 pacientes que no pudieron asignarse a ninguno de los subtipos anteriores. No se encontraron pacientes que pertenecieran a más de un subtipo.

Análisis de capacidad de expresión del gen c-MAF para predecir metástasis, metástasis ósea, en una cohorte de cáncer de mama triple negativo

Al analizar la metástasis ósea en la cohorte I, 33 pacientes se eliminaron debido a tener metástasis ósea y otras metástasis al mismo tiempo, mientras que sólo se informó de un evento. Se tenía interés en la primera metástasis, y dado que no había manera de saber cuál de las metástasis fue la primera se retiró del análisis a los pacientes con dos anotaciones de sitio de metástasis.

Una vez identificado el subtipo de interés, triple negativo (que incluye una gran proporción de los cánceres de mama de tipo basal) y seleccionados los pacientes, se ajustó el modelo de riesgos proporcionales de Cox (usando la función R coxph del paquete de funciones de supervivencia) para ver si se podría explicar cada fenotipo (metástasis ósea) a través de subtipo y de la expresión de c-MAF, incluyendo la cohorte como variable de ajuste. c-MAF presentaba un efecto de interacción estadísticamente significativo con el subtipo ($p = 0,043$). Esto apuntó a que la asociación entre c-MAF y la supervivencia difirió significativamente según el subtipo de los pacientes. La expresión génica de c-MAF

en los tumores primarios de mama triple negativos se correlacionaba significativamente con metástasis ósea. (Tabla 3 y figura 2).

Tabla 3. Análisis de supervivencia

Subtipo	n	Cociente de riesgo	Intervalo de confianza del 95%	valor de p
Triple negativo	164	1,444	[1,016-2,054]	0,040

c-MAF puede usarse para determinar el pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cáncer de mama triple negativo (que incluye una gran proporción de cánceres de mama tipo basal) (tabla 3 y figura 2).

Análisis de la capacidad de expresión del gen c-MAF para predecir metástasis, metástasis ósea, en tumores de cáncer de mama ER+.

Se puso el foco en cánceres de mama ER+ (que incluyen una gran proporción de cánceres de mama luminales, incluyendo subtipos A y B). Se ajustaron modelos de riesgos proporcionales de Cox (usando la función R coxph del paquete de funciones de supervivencia) para ver si podría explicarse cada fenotipo (metástasis ósea, metástasis pulmonar o metástasis cerebral) a través de la expresión de c-MAF. La expresión génica de c-MAF en tumores primarios de cáncer de mama ER+ se correlacionaba significativamente con metástasis ósea. (Tabla 4 y figura 3).

Tabla 4. Análisis de supervivencia

Subtipo	n	Cociente de riesgo	Intervalo de confianza del 95%	valor de p
Positivo para receptor de estrógeno	349	1,22	[1,014-1,473]	0,032

Puede usarse c-MAF para determinar el pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cánceres de mama ER+ (que incluyen una gran proporción de cánceres de mama luminales, incluyendo subtipos A y B) (tabla 4 y figura 3).

Validación de que c-MAF es un biomarcador clínico para metástasis ósea de cáncer de mama en la cohorte II mediante inmunohistoquímica, en particular en ER+ y TN

Se realizó inmunotinción de c-MAF usando secciones de tejido tumoral de BC humano de 3 µm, colocadas sobre portaobjetos de vidrio cargados positivamente en una plataforma Dako Link. Después de la desparafinización, se realizó la recuperación de antígeno térmica en solución tamponada a base de citrato 0,01 mol/l de pH 6,1 (Dako). La peroxidasa endógena se extinguió. Se usó un anticuerpo anti-MAF policlonal de conejo durante 30 minutos a temperatura ambiente, dilución 1:100, seguido de incubación con un polímero dextrano de Ig anti-conejo acoplado con peroxidasa (Flex+, Dako). Se visualizaron entonces las secciones con 3,3'-diaminobencidina (DAB) y se les aplicó contratinción con hematoxilina.

La sensibilidad del anticuerpo frente a c-MAF (1:100) se había calculado en una gama de diluciones crecientes de anticuerpo primario desde 1:10 hasta 1:1000. Se determinó la especificidad usando células BC humanas MCF7 y T47D que sobreexpresan c-MAF y parentales (más c-MAF largo/corto). Se procesaron sedimentos de células fijadas en formalina según lo descrito para IHC y los resultados se confirmaron por inmunotransferencia de tipo Western a partir de lisados completos. También se mostró especificidad en xenoinjertos de MCF7 que sobreexpresan c-MAF y MCF7 heterotópicos en ratones desnudos BALB-c. Se usaron como controles negativos secciones de los mismos especímenes incubados con IgG2 de conejo normal (IS600, Dako) en lugar de anticuerpos primarios.

La inmunotinción de c-MAF se puntuó mediante una medición computarizada. Se adquirieron nueve imágenes representativas de cada espécimen a intervalos de longitud de onda de 10 nm entre 420 y 700 nm, usando un microscopio Leica DM2000 equipado con el sistema de adquisición de imágenes multiespectrales Nuance FX (CRI, Inc.). Antes de adquirir un conjunto de datos espectrales de una imagen, se realizó una rutina de exposición automática mientras se tomaba una imagen de un área en blanco de portaobjetos para determinar el tiempo de exposición necesario para llenar aproximadamente el 90% de los pocillos del dispositivo a cada longitud de onda para compensar variaciones de la intensidad de la fuente, la eficiencia de transmisión del filtro y la sensibilidad de la cámara. Se creó una biblioteca de colores de colorante DAB y hematoxilina puros y se usó para separar los colores usando el software Nuance 1.6.4. A continuación se adquirió un cubo (pila de imágenes tomadas a las diferentes longitudes de onda) de referencia para cada nuevo caso, seguido de obtención de imágenes espectrales de tres campos de tejidos representativos usando los mismos tiempos de exposición. Después de la deconvolución de las imágenes, los datos espectrales se sometieron a corrección de campo plano para compensar la irregularidad en la iluminación y se filtró el fondo. Las señales positivas se convirtieron de unidades de transmisión a unidades de densidad óptica tomando el

registro negativo de la razón de la muestra dividida entre el cubo de referencia usando una conversión de la ley de Beer. Se estableció un umbral asistido por ordenador, que crea una imagen en pseudo-color que resalta todas las señales positivas. El análisis produjo datos cuantitativos de c-MAF a partir de la intensidad promedio de las regiones de interés. Solo los núcleos de las células epiteliales (normales y malignas), pero no las células estromales o los linfocitos, se detectaron automáticamente al establecer un umbral de tamaño distinto y esto lo confirmó un patólogo. Cada caso se calculó para el valor medio de la intensidad de señal de todas las regiones de interés para el análisis estadístico. La salida de la medición computarizada produjo datos continuos que oscilan entre 56 y 70.367 para la expresión de c-MAF.

Se muestran inmunotinciones de c-MAF representativas (IHC) de tejidos de cáncer de mama primario (figura 4a). El caso 1 representa tumores negativos para c-MAF (DO<1000). Los casos 2 y 3 son tumores positivos para c-MAF (DO >1000 y >25000 respectivamente) (figura 4a). A continuación, un gráfico que representa la expresión de proteína c-MAF (medición computarizada y expresada como unidades arbitrarias de densidad óptica, DO) en una cohorte de 380 tumores de cáncer de mama primarios resumió toda la cuantificación de señal de IHC de tumor. Los tumores se segregaron según subtipo de BC (ER+, HER2+ y TN) (figura 4b). Basándose en las tinciones de IHC anteriores, se realizó una curva Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad (figura 4c) y supervivencia libre de metástasis ósea (figura 4d) en la cohorte de 380 tumores de cáncer de mama primarios (estadio I, II y III) según la estratificación de c-MAF (positivo o negativo). También se calculó el rendimiento diagnóstico de c-MAF en diferentes subtipos de BC (ER+, HER2+ y TN) (figura 4e). Las características iniciales y el análisis multivariante de Cox se realizaron tal como se definió anteriormente para determinar la influencia sobre c-MAF como criterios de estratificación para la predicción de metástasis ósea en tumores de cáncer de mama primarios de cualquier otro parámetro patológico clínico (tabla 5 y 6). Tal como se muestra, no hay asociación significativa con ningún otro parámetro con la excepción de que tiene más de 9 ganglios linfáticos positivos.

Tabla 5. Características iniciales según expresión de IHC de c-MAF

Características	Serie completa (n=380)		Sin sobreexpresión de c-MAF (n=309)		Sobreexpresión de c-MAF (n=71)		P
	N.º de pacientes	%	N.º de pacientes	%	N.º de pacientes	%	
Edad (mediana, intervalo)	58, 26-90		58, 31-90		59, 26-90		
Estado menopáusico							0,726
Premenopáusico	111	29,2	89	28,8	22	31,0	
Postmenopáusico	269	70,8	220	71,2	49	69,0	
Tamaño de tumor, mm							0,447
≤20	209	55,0	168	54,4	41	57,7	
21-50	113	35,0	112	36,2	21	29,6	
>50	38	10,0	29	9,4	9	12,7	
Grado de tumor							0,782
I	67	17,6	56	18,1	11	15,5	
II	184	48,4	150	48,5	34	47,9	
III	129	33,9	103	32,9	26	36,6	
Nodos linfáticos							0,622
Ninguno	227	59,7	182	58,9	45	63,4	
1-3	90	23,7	78	25,2	12	16,9	
4-9	40	10,5	31	10,0	9	12,7	
>9	23	5,1	18	5,8	5	7,0	
Estado de receptor de estrógeno							0,807
Negativo	97	25,5	78	25,2	19	26,8	
Positivo	283	74,5	231	74,8	52	73,2	
Estado de receptor de progesterona							0,481
Negativo	133	35,0	106	34,3	27	38,0	
Positivo	247	65,0	203	65,7	44	62,0	
Estado de HER2							0,358
Negativo	303	79,7	243	78,6	60	84,5	
Positivo	77	20,3	66	21,4	11	15,5	
Proliferación (Ki-67)							0,105
Baja proliferación (<15%)	278	73,2	232	75,1	46	64,8	
Alta proliferación (≥15%)	102	26,8	77	24,9	25	35,2	

Abreviaturas: HER2, receptor de crecimiento epidérmico humano 2

Tabla 6. Análisis de BDFS en pacientes con expresión de IHC de c-MAF

Variable	Univariada (n=380)			Multivariada (n=380)		
	HR	IC del 95%	P	HR	IC del 95%	P
Estado menopáusico			0,818			-
Premenopáusico				-		
Postmenopáusico	1,00	0,42 a 1,97		-	-	
Tamaño de tumor, mm	0,91		0,067			-
≤20				-		
21-50	1,00	1,08 a 5,41		-	-	
>50	2,42	0,76 a 7,70		-	-	
Grado de tumor	2,41		0,062			0,130
I				1,00		
II	1,00	0,81 a 45,8		4,41	0,58 a 33,503	
III	5,71	0,74 a 44,27		2,61	0,31 a 21,57	
Nodos linfáticos			0,005			0,006
Ninguno	1,00			1,00		
1-3	1,59	0,65 a 3,90		1,47	0,59 a 3,68	
4-9	0,88	0,20 a 4,09		0,96	0,21 a 4,35	
>9	6,72	2,64 a 17,10		6,89	2,56 a 18,56	
Estado de receptor hormonal			0,124			
Negativo	1,00			-		
Positivo	0,54	0,25 a 1,15		-		
Estado de HER2			0,775			-
Negativo	1,00			-		
Positivo	0,87	0,33 a 2,28		-	-	
Proliferación (Ki-67)			0,029			0,133
Baja proliferación (<15%)	1,00			1,00		
Alta proliferación (≥15%)	2,32	1,11 a 4,82		1,85	0,84 a 4,06	
c-MAF (IHC)			<0,001			1e-05
Sin sobreexpresión	1,00			1,00		
Sobreexpresión	5,24	2,53 a 10,87		5,62	2,65 a 11,95	

Abreviaturas: BDFS, supervivencia libre de enfermedad ósea; HR, razón de riesgo; IC, intervalo de confianza; HER2, receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2

Validación funcional de c-MAF en un ensayo de colonización de metástasis ósea

La contribución causal de c-MAF se ha validado funcionalmente en un ensayo de colonización de metástasis ósea utilizando modelos experimentales preclínicos de xenoinjertos de ratón. Se usaron líneas celulares humanas de cáncer de mama ER+, concretamente células MCF7 marcadas con vector de GFP/luciferasa y se inocularon en ratones inmunodeficientes por medio de inyección intra-ventricular o inyección en la vena de la cola. Estos ratones deben llevar gránulos de estrógeno para garantizar el suministro de hormonas para las células tumorales adyacentes en el modelo de xenoinjerto.

El enfoque estándar fue experimentos de pérdida y ganancia de función. c-MAF se expresó o silenció en células parentales MCF7, T47D o derivados altamente metastásicos a hueso que se seleccionaron para altos niveles de expresión de c-MAF (BoM2) para validar su función en la metástasis (figuras 5 y 6). Las funciones de c-MAF en metástasis óseas se determinaron *in vivo* usando detección de bioluminiscencia de células metastásicas inoculadas en los ratones por vía intracardiaca. Se generó inactivación de c-MAF mediada por ARNhp en células BoM2 que redujo el nivel de c-MAF endógeno en más del 80%, y pudo rescatarse por sobreexpresión exógena de c-MAF (figura 6). Además, también se generaron células que expresaban cada isoforma de c-MAF de manera individual o colectiva, y se sometió a prueba su funcionalidad como activador transcripcional en ensayos de indicadores (figura 6). Se inyectaron células parentales MCF7, células parentales T47D con o sin c-MAF (isoformas corta y larga de manera individual o colectiva) y derivados de células MCF7 metastásicas a hueso BoM2 agotadas o rescatadas para la expresión de c-MAF (isoformas corta y larga) en el ventrículo izquierdo de un ratón y se analizó la colonización de hueso por obtención de imágenes de bioluminiscencia *in vivo*. En todos los casos, se inocularon los correspondientes controles (figuras 5, 6, 7 y 8).

Solo el 23% de los ratones inoculados con células inactivadas de c-MAF BoM2 desarrollaron metástasis ósea, en comparación con el 90% en células control sh BoM2 (es decir, que expresan c-MAF) o el 50% en el grupo de rescate (figuras 5c y 8) al día 52 después de la inyección. La reducción de metástasis ósea en células agotadas en c-MAF se acompañó con una fuerte reducción en la extensión de las lesiones osteolíticas de extremidades posteriores (figura 5c). Por el contrario, la sobreexpresión de MAF, o bien cada isoforma de manera individual o bien colectiva, aumentó la capacidad y la carga metastásica de las células de cáncer de mama ER+ (MCF7 y T47D) a metastatizarse al hueso después de la inyección intracardiaca (figuras 5a, b y 7). De manera interesante, células que expresan MAF producen más metástasis ósea osteolítica en comparación con las células MCF7 parentales (figuras 5a, 6 y 9a), y aumentó el número de osteoclastos con fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP+) en el perímetro de la lesión metastásica que podían detectarse (figuras 9b, c, d). La sobreexpresión de MAF no aumentó la actividad proliferativa intrínseca de las células MCF7 parentales cuando se implantaron por vía subcutánea (figura 10). Altos niveles de expresión de MAF no apoyaron la colonización pulmonar (figura 5d).

Los experimentos de pérdida y ganancia de función junto con la validación clínica en los tumores primarios de cáncer de mama han llevado a la validación funcional de c-MAF como marcador pronóstico y predictivo y gen diana causal en los procesos de metástasis óseas en cánceres de mama positivos para receptor de estrógeno (incluyendo los subtipos moleculares luminal A y B) y triple negativo (incluyendo el subtipo molecular de tipo basal).

MAF media en la metástasis ósea osteolítica a través de la estimulación por células tumorales de la diferenciación de osteoclastos, por ejemplo, a través del control transcripcional de citocina PTHLH.

Sin una actividad directa de c-MAF para proporcionar funciones de metástasis ósea a células de cáncer de mama, c-MAF puede, en su lugar, controlar transcripcionalmente la actividad de genes que promueven la capacidad de asentamiento y remodelación ósea para colonizar el hueso. La expresión de PTHLH estaba bajo el control de c-MAF. Una observación confirmada por análisis de qPCR (figura 11a). Además, la metástasis de cáncer de mama del paciente (GSE14020) que crece en el hueso retuvo expresión de c-MAF en comparación con metástasis en otros lugares (figura 11b). Además, el 77% de las metástasis que expresan MAF y PTHLH por encima del promedio fueron metástasis óseas (figura 11b). Se identificó PTHLH como el factor responsable de la hipercalcemia humoral de tumor maligno. Además, se ha mostrado que desempeña un papel fundamental en la metástasis ósea osteolítica debido a estimulación, en parte, de la diferenciación de osteoclastos. De hecho, los medios condicionados de células que expresan c-MAF mejoraron la inducción de diferenciación de osteoclastos *in vitro*, un proceso que se impide tras la incubación conjunta con péptido antagonista de PTHLH (7-34Aa, PTHLHAN) (figura 11c).

Para someter a prueba si PTHLH media en la metástasis ósea impulsada por c-MAF en células de cáncer de mama, se inyectaron células de cáncer de mama MCF7 que expresan c-MAF por vía intracardiaca y se evaluó su capacidad para establecer y hacer crecer metástasis ósea en presencia o ausencia de PTHLH-AN durante el lapso de 47 días. Con el fin de bloquear la actividad de PTHLH *in vivo*, se administró a animales, dos veces al día, 6 µg de (7-34 Aa) PTHLH-AN disuelto en PBS. Los grupos control se trataron con PBS. Las células que expresan c-MAF producen metástasis ósea con una penetración similar, sin embargo, el tratamiento con PTHLH-AN provoca una reducción drástica en la extensión de las lesiones osteolíticas de extremidades posteriores (figuras 11d, e). Esta reducción estuvo acompañada de una reducción en el número de osteoclastos (células TRAP+) en el perímetro de lesión metastásica (figuras 11d, e). Estos resultados indican que c-MAF impulsa metástasis ósea osteolítica de cáncer de mama. Además, la expresión de PTHLH es un factor necesario para la metástasis ósea de cáncer de mama osteolítica impulsada por c-MAF. Finalmente, el bloqueo del proceso de diferenciación de osteoclastos previene la metástasis ósea de cáncer de mama impulsada por c-MAF.

Capacidad de c-MAF para predecir metástasis ósea depende de la dosis

En primer lugar, se evaluó si la capacidad de la expresión de c-MAF para predecir metástasis ósea era dependiente de la dosis.

La información de los pacientes se había descargado de GEO (Barrett *et al.* (2007)). Se utilizó el siguiente conjunto de datos: la unión de GSE2603, GSE2034 y GSE12276. Esta cohorte de unión contaba con 560 pacientes. Con el fin de eliminar los sesgos sistemáticos antes de la fusión, las mediciones de expresión se convirtieron en puntuaciones z para todos los genes.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con Bioconductor (Gentleman RC *et al* Genome Biology, 5:.. R80, 2004 URL <http://genomebiology.com/2004/5/10/R80>).

Se obtuvo una estimación suave de la relación entre la expresión de c-MAF y la razón de riesgo de metástasis ósea a través de un modelo de regresión de Cox con splines cuadráticos (función smoothCoxph en el paquete phenoTest). La función de smoothCoxph en el paquete phenoTest representa gráficamente el riesgo proporcional de Cox suavizado por el nivel de expresión génica. Por lo tanto, construye un gráfico que muestra cómo se comporta el riesgo en los diferentes niveles de expresión de un gen dado. También se proporcionan intervalos de confianza (Uso: smoothCoxph (hora, evento, x, XLIM, ylim, otros ... Argumentos: Tiempo) variable donde se almacena el tiempo de supervivencia; eventos) variable donde se almacena el caso de supervivencia. x) expresión numérica que contiene los niveles de

expresión de un gen dado. Xlim) xlim del gráfico. Ylim) ylim del gráfico; Otros ...) otros argumentos que se pasarán al gráfico).

La relación entre la expresión de c-MAF y la razón de riesgo de metástasis ósea a través de un modelo de regresión de Cox con splines cuadráticos puede verse en la figura 5. Todos los tumores de cáncer de mama presentes en la cohorte de unión, los tumores de cáncer de mama positivos para receptor de estrógeno en la cohorte de unión y los tumores triple negativos en la cohorte de unión. Se llevó a cabo el análisis y se indicó la razón de riesgo (HR) y el valor de p de la capacidad de c-MAF para predecir metástasis óseas en tumores cuyo nivel de expresión de c-MAF estaba por encima del promedio (denominado 0). 1 en el nivel de expresión indica 1 desviación estándar y luego posteriormente, etc.

Se definieron tumores primarios de cáncer de mama que expresan "alto c-MAF" como el grupo de tumores que expresan c-MAF por encima del promedio de expresión en una cohorte representativa de tumores primarios de cáncer de mama. Se definieron tumores primarios de cáncer de mama que expresan "bajo c-MAF" como el grupo de tumores que expresan c-MAF por debajo del promedio obtenido en una cohorte representativa de tumores primarios de cáncer de mama.

En tumores de cáncer de mama con un alto nivel de expresión de c-MAF, la expresión de c-MAF predice el riesgo de metástasis ósea de una manera dependiente de la dosis (figura 5). De manera similar, en los subtipos de cáncer de mama ER positivo (incluyendo los subtipos moleculares luminal A y B) y triple negativo (incluyendo el subtipo molecular de tipo basal) se observó el mismo comportamiento (figura 12).

En conclusión, cuanto más alto sea el nivel de expresión de c-MAF, mayor es el riesgo de metástasis óseas en tumores de cáncer de mama ER + y TN que expresan niveles de c-MAF por encima del promedio de un conjunto representativo de tumores de cáncer de mama.

Se sometió a ensayo en la cohorte de validación II hasta qué punto cuanto mayor es la dosis de c-MAF mayor es el riesgo de recaída ósea. Con este fin, se cuantificó la expresión de c-MAF por inmunohistoquímica (IHC) mediante la determinación de la densidad óptica de la tinción usando un sistema computarizado tal como se describió anteriormente (figura 4a, b). La tinción de c-MAF es específica de las células tumorales (figura 4a). Basándose en la tinción pueden observarse dos tipos de tumores de cáncer de mama positivos para c-MAF (caso 2 y 3, figuras 4a, b). Según estos dos tipos de tinción de IHC de c-MAF en tumores de cáncer de mama positivos para c-MAF, pueden separarse en dos grupos ya que tienen un comportamiento bimodal (figura 13, panel izquierdo). A partir de estas dos categorías, se validó la observación de que cuanto mayor es la tinción de c-MAF, mayor es el riesgo de metástasis ósea (HR (metástasis ósea) = 19,45; valor de $p < 0,001$) y más pronto se produce la metástasis ósea (figura 13, panel derecho).

Capacidad de c-MAF para predecir la metástasis ósea temprana

Los cánceres de mama se clasificaron en tumores con recurrencia temprana (< 5 años) y tardía (>5 años) en función del lapso de tiempo entre la detección del tumor primario y la resección quirúrgica y el momento de la observación de recaída distante. De hecho, en ciertas circunstancias la recaída distante temprana se limitó incluso a un período de tiempo más corto. Esta clasificación es de importancia clínica, dado que se ha descrito que los tumores ER positivos y negativos presentan un comportamiento diferente en cuanto a la recaída temprana en hueso. En detalle, los tumores ER negativos, incluidos los subtipos triple negativo y de tipo basal, reaparecen en puntos tiempos tempranos, mientras que los tumores ER positivos tienen la misma tendencia a reaparecer en momentos tempranos y tardíos (Knight WA, et al Cancer Research 1997: 37, 4669 - 4671, Goss PE Nature Rev Cancer 2010: 10, 871-877).

Se evaluó si la expresión de c-MAF puede predecir la metástasis ósea temprana en cáncer de mama, en tumores primarios de cáncer de mama ER positivos (incluyendo luminal A y B) y triple negativos (incluyendo de tipo basal).

La información de los pacientes se había descargado de GEO. Se utilizó el siguiente conjunto de datos: la unión de GSE2603, GSE2034 y GSE12276. Esta cohorte de unión contaba con 560 pacientes. Con el fin de eliminar los sesgos sistemáticos antes de la fusión, las mediciones de expresión se convirtieron en puntuaciones z para todos los genes. Todos los análisis estadísticos se realizaron con Bioconductor.

Se realizó la prueba exacta de Fisher para someter a prueba la independencia de c-MAF y la metástasis ósea en los diferentes puntos de tiempo. Las proporciones de la tabla de contingencia y los valores de p de la prueba de Fisher se pueden ver en la figura 14.

Se definen tumores primarios de cáncer de mama con expresión "muy alta de c-MAF" como el grupo de tumores que expresan c-MAF por encima del promedio más una desviación estándar. Se definieron tumores primarios de cáncer de mama con expresión "baja de c-MAF" como el grupo de tumores que expresan c-MAF por debajo del promedio más una desviación estándar en una cohorte representativa de tumores primarios de cáncer de mama.

En los tumores primarios de cáncer de mama, niveles de c-MAF muy altos (ARN o proteína) predicen metástasis ósea

temprana (figura 14), tanto a los 3 como a los 5 años después de la cirugía de tumores primarios de cáncer de mama.

En particular, se demuestra que en tumores positivos para receptor de estrógeno (incluyendo los subtipos moleculares luminal A y B), los niveles de c-MAF (ARN o proteína) definen significativamente la proporción de tumores con metástasis ósea temprana (figura 14) tanto a los 3 como a los 5 años después de la cirugía, respectivamente.

En conclusión, altos niveles de expresión de c-MAF se pueden utilizar para discriminar o predecir tumores primarios de cáncer de mama que presentan alto riesgo de metástasis ósea, incluyendo el riesgo de metástasis ósea temprana de cáncer de mama.

La tabla 7 muestra la predicción de metástasis óseas, metástasis óseas tempranas y metástasis óseas muy tempranas en tumores primarios de cáncer de mama (unión de GSE2603, GSE2034 y GSE12276), tumores primarios de cáncer de mama positivos para receptor de estrógeno (incluyendo los subtipos moleculares luminal A y B) y subtipos de cáncer de mama triple negativos (incluyendo el subtipo molecular de tipo basal).

Tumores primarios de cáncer de mama ER+ (c-MAF > promedio)			
HR	IC.bajo	IC.alto	Valor de p
Metástasis ósea	1,56	3,87	0,00017
Metástasis ósea temprana (< 5 años)	1,20	3,20	0,00853
Metástasis ósea muy temprana (< 3 años)	1,25	3,62	0,00694

Tumores primarios de cáncer de mama triple negativo (c-MAF > promedio, n=96)

Tabla 7: HR (razón de riesgo), IC (intervalo de confianza)

HR	IC.bajo	IC.alto	Valor de p
Metástasis ósea	1,15	3,97	0,02262
Metástasis ósea temprana (< 5 años)	1,04	4,02	0,04534
Metástasis ósea muy temprana (< 3 años)	1,09	3,87	0,03276

Amplificación de la región cromosómica ubicada en 16q22-q24 que incluye c-MAF está asociada con metástasis ósea

Se identificaron alteraciones del número de copias (CNA) en especímenes de cáncer de mama primario asociadas al riesgo de metástasis mediante una adaptación del algoritmo de ACE (análisis de CNA mediante datos de expresión) (figura 15a). Entre las mismas, una región amplificada ubicada en el cromosoma 16q22-q24 se asoció significativamente ($p < 0,05$) con riesgo de metástasis e incluía c-MAF, un gen cuya expresión incrementada se asoció de manera individual e independiente con riesgo de metástasis ósea en cáncer de mama humano ER+ (HR=1,22 $p=0,032$, conjunto de datos de tumor primario de cáncer de mama basándose en la unión de GSE2603, GSE2034 y GSE12276). De manera similar, al comparar células MCF7 parentales (ER+) con derivados de MCF7 metastásicos a hueso (BoM2) por FISH (16q23) e hibridación genómica comparativa (CGH), se confirmó una ganancia en la región cromosómica 16q22-24 (figuras 15b, c). Un subconjunto de células parentales (32,7%) portaba esta amplificación genómica, sin embargo, la selección de metástasis ósea *in vivo* condujo a que esta población residual se hiciese cargo del resto (88,6%). Por tanto, se mostró que la 16q22-q24 se amplifica en cánceres de mama con riesgo de metástasis, particularmente metástasis ósea y se corroboró en células seleccionadas *in vivo* por su capacidad de metástasis al hueso.

Validación en cohorte II de la capacidad pronóstica para predecir metástasis ósea de la amplificación genómica de ADN 16q22-24 por determinación de FISH.

Para validar adicionalmente la capacidad de la amplificación genómica de 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 diagnóstica disponible comercialmente que determina la región genómica 16q23, la sonda IGH/MAF Abbot Vysis) en un conjunto de validación independiente compuesto por 334 especímenes de cáncer de mama primario de pacientes con estadio de BC I, II o III y seguimiento anotado (Rojo F., Ann Oncol (2012) 23 (5): 1156-1164). Se procesaron microalineamientos tisulares según procedimientos estándar. Los portaobjetos se incubaron con mezcla de sondas de MAF (16q23) e IGH (14q32) (sonda Abbot vysis). Se aplicó contratinción con DAPI y se adquirieron imágenes con un microscopio adecuado.

Se determinó la curva de Kaplan-Meier de hueso (figura 16a) de supervivencia global o libre de metástasis (figura 16b) en el conjunto de tumor primario humano de BC en estadios I, II y III (n=334). Los pacientes se estratificaron según el grupo negativo para FISH de 16q23 y positivo para FISH de 16q23 basándose en el corte de 2,5 copias de 16q23 por célula como promedio, usando 3 núcleos por tumor (figuras 16a y b). Se calculó la razón de riesgo (metástasis ósea), especificidad y sensibilidad del marcador para predecir metástasis ósea. Se realizaron características iniciales del conjunto de datos y análisis multivariante de Cox para cánceres de mama globales tal como se describió anteriormente (tablas 8 y 9).

También se determinó la curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de metástasis ósea para pacientes ER-positivos (izquierda) o triple negativos (derecha) en el conjunto de tumor primario humano en estadio de BC I, II y III (n=250 y n=43 respectivamente) (figura 16c). Los pacientes se dividieron en grupo negativo para FISH de 16q23 y positivo para FISH de 16q23 basándose en el corte de 2,5 para copias de 16q23 por célula como promedio, usando 3 núcleos por tumor. Se realizó análisis multivariante de Cox para cánceres de mama ER+ tal como se describió anteriormente (tabla 10)

Tabla 8 Comparación de características iniciales por FISH (MAF) de 16q23 >2,5 copias por célula. Medido en 3 núcleos por tumor. (*Porcentajes calculados sobre los pacientes sin valores ausentes en esta variable)

	FISH de 16q23 (MAF) ≤ 2,5 (n=262)	FISH de 16q23 (MAF) > 2,5 (n=75)	valor de p
Edad media (IQR), años	58 (17)	58 (21)	0,32
Postmenopáusica (%)	187 (71,4)	46 (61,3)	0,10
ER+ (%)	200 (76,4)	53 (70,7)	0,32
PR+ (%)	172 (65,7)	45 (60,0)	0,37
Alto grado (%)	83 (31,7)	35 (36,7)	0,016
Ki67* (%)	55 (22,3)	29 (41,4)	0,0014
Subtipo* (%)			0,58
Luminal	151 (66,5)	39 (66,1)	
Her2	44 (19,4)	9 (15,3)	
TN	32 (14,1)	11 (18,6)	
HER2+ (%)	51 (19,5)	13 (17,3)	0,68
pT (%)			0,21
1	164 (62,6)	41 (54,7)	
2-4	98 (37,4)	34 (45,3)	
pN (%)			0,27
0	163 (62,2)	42 (56,0)	
1-2	89 (34,0)	27 (36,0)	
3	10 (3,8)	6 (8,0)	

Tabla 9 Cáncer de mama en estadio I, II, III

Regresión de Cox del tiempo hasta metástasis ósea como primer sitio de recaída. FISH de 16q23(MAF) >2,5 copias por célula. Medidos 3 núcleos por tumor

Variable	Univariado HR (IC del 95%)	valor de p	Multivariado HR (IC del 95%)	valor de p
16q23Fish>2,5	27,2 (8,1-91,0)	< 0,0001	26,1 (7,8-87,4)	< 0,0001
Ki67	2,8 (1,2-6,4)	0,014		
pT				
1	Ref		Ref	
2-4	2,4 (1,1-5,3)	0,035	2,1 (0,9-4,6)	0,077
pN				
0	Ref			
1-2	1,4 (0,6-3,3)	0,44		
3	4,8 (1,5-15,1)	0,0076		

Tabla 10 Cáncer de mama ER+ en estadio I, II, III

Regresión de Cox del tiempo hasta metástasis ósea como primer sitio de recaída. FISH de 16q23(MAF) >2,5 copias por célula. Medidos 3 núcleos por tumor

Variable	Univariado HR (IC de 95%)	valor de p	Multivariado HR (IC de 95%)	valor de p
16q23Fish>2,5	53,5 (7,0-406,7)	0,0001	49,5 (6,5-376,3)	0,0002
pT				
1	Ref		Ref	
2-4	3,4 (1,2-9,4)	0,018	2,8 (1,0-7,9)	0,047
pN				
0	Ref			
1-2	2,6 (0,8-8,0)	0,094		
3	6,8 (1,6-28,8)	0,0089		

También se calcularon curvas de características operativas del receptor (ROC) para el rendimiento diagnóstico de la amplificación de 16q23 en general (figura 16d) y cáncer de mama ER+ (figura 16e) para estimar el rendimiento

diagnóstico. En una curva de ROC, la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) se representa gráficamente en función de la tasa de falsos positivos (100-especificidad) para diferentes puntos de corte. Cada punto de la curva ROC representa un par de sensibilidad/especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular.

- 5 En resumen, la amplificación de 16q22-24 medida en el presente documento usando una sonda de FISH de 16q23 predice significativamente el riesgo de metástasis ósea en tumores primarios de cáncer de mama, particularmente en subtipos de cáncer de mama ER+ y TN.

10 Determinación del régimen de tratamiento en sujeto diagnosticado de cáncer de mama triple negativo basada en niveles de expresión de c-MAF

Se obtiene una muestra de tejido tumoral de un sujeto diagnosticado con cáncer de mama triple negativo. La muestra se secciona en cortes finos de tejido y se embebe en parafina. Cada sección de parafina se monta en un portaobjetos. Los portaobjetos se incuban con anticuerpo anti-MAF. Para la visualización y detección de anticuerpos unidos a MAF, se usan anticuerpos conjugados con colorante fluorescente. Los portaobjetos se visualizan proporcionando haces de excitación a los colorantes fluorescentes. Se toman imágenes de señales de fluorescencia por microscopios de fluorescencia. El nivel de expresión relativo de c-MAF en la muestra tumoral se obtiene comparando la señal de fluorescencia en la muestra tumoral con la de una muestra de referencia. La intensidad de la muestra tumoral se correlaciona con la intensidad de la muestra de referencia, en la que una mayor intensidad en la muestra tumoral en comparación con la muestra de referencia se correlaciona con un mayor riesgo de que el sujeto tenga metástasis de cáncer primario de mama al hueso. Alternativamente, se determinaron la amplificación o translocación del locus 16q22-24, locus 16q23 o gen c-MAF usando una técnica de hibridación *in situ* o similar

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

Se entiende que los ejemplos descritos en el presente documento son meramente ilustrativos y que a los expertos en la técnica se les ocurrirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos.

Lista de secuencias

<110> InBioMotion, S.L.
Gomis, Roger
Pavlovic, Milica
Planet, Evarist
40 Arnal, Anna
Tarragona, María

<120> Método para el pronóstico y tratamiento de metástasis de cáncer

45 <130> 3190.001PC03/TJS

<140> Por asignar
<141> Con la presente

50 <150> 61/621.949
<151> 09-04-2012

<150> EP1232139.3
<151> 09-04-2012

55 <150> 61/724.807
<151> 09-11-2012

60 <150> 61/732.175
<151> 09-11-2012

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

65 <210> 1

ES 2 798 107 T3

<211> 6878
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 1

agaggcttta	aaatcttttt	tcattcttcta	gctgtagctc	gggctgcttg	tcggcttggc	60
ctccccctcc	cccccttget	ctctgcctcg	tctttcccca	ggacttcgct	atcttgcttt	120
tttaaaaaaa	ggcaagaaag	aactaaactc	ccccctccct	ctcctccagt	cgggctgcac	180
ctctgccttg	cactttgcac	agaggtagag	agcgcgcgag	ggagagagag	gaaagaaaaa	240
aaataataaa	gagagccaag	cagaagagga	ggcgagaagc	atgaagtgtt	aactcccccg	300
tgccaaggcc	cgcgcgcgcc	ggacagacgc	ccgccgcgcc	tccagccccg	agcggacgcc	360
gcgcgcgcgc	tgcttgcagc	ccgggccggc	gaggcgagcc	cttctttatg	caaagcgcgc	420
agcggagcgg	cgagcggggg	acgccgcgca	ccgggccggg	ctcctccagc	ttcgccgccg	480
cagccaccac	cgccgccacc	gcagctcgcg	gaggatcttc	ccgagcctga	agccgccggc	540
tcggcgcgca	aggaggcgag	cgagcaagga	ggggccgggg	cgagcgaggg	agcacattgg	600
cgtgagcagg	ggggagggag	ggcgggcgcg	gggggcgcgc	gcagggcggg	ggggtgtgtg	660
tgtgagcgcg	ctcggagggt	tcgggccagc	caccgccgcg	caagctagaa	gcgccccagc	720
ccggcaagct	ggctcaccgc	ctggccaccc	agcacagccc	gctggcccct	ctcctgcagc	780

ccatctggcg	gagcggcggc	ggcggcggcg	gcggcggcag	gagaatggca	tcagaactgg	840
caatgagcaa	ctccgacctg	cccaccagtc	ccctggccat	ggaatatgtt	aatgacttcg	900
atctgatgaa	gtttgaagtg	aaaaaggaac	cggtggagac	cgaccgcata	atcagccagt	960
gcggccgtct	catcgccggg	ggctcgctgt	cctccacccc	catgagcacg	ccgtgcagct	1020
cggtgcccc	ttccccagc	ttctcggcgc	ccagcccggg	ctcgggcagc	gagcagaagg	1080
cgcacctgga	agactactac	tggatgaccg	gctaccgcga	gcagctgaac	cccgaggcgc	1140
tgggcttcag	ccccgaggac	gcggtcgagg	cgctcatcag	caacagccac	cagctccagg	1200
gcggcttcga	tggctacgcg	cgcggggcgc	agcagctggc	cgcggcggcc	ggggccggtg	1260
ccggcgccctc	cttgggcggc	agcggcgagg	agatgggccc	cgcgcggccc	gtggtgtccg	1320
ccgtgatcgc	cgcggccggc	gcgcagagcg	gcgcgggccc	gcactaccac	caccaccacc	1380
accacgccgc	cggccaccac	caccaccgga	cggccggcgc	gcccggcgcc	gcgggcagcg	1440
cggccgcctc	ggccggtggc	gctggggggc	cgggcggcgg	tggcccgggc	agcgtgggg	1500
gcggcggcgg	cggcggcggc	ggcggaggcg	gcgggggcgc	ggcggggggc	gggggcgcc	1560
tgcaccgcga	ccacgccgcc	ggcggcctgc	acttcgacga	ccgcttctcc	gacgagcagc	1620
tggtgaccat	gtctgtgcgc	gagctgaacc	ggcagctgcg	cggggtcagc	aaggaggagg	1680
tgatccggct	gaagcagaag	aggcggaccc	tgaaaaaccg	cggctatgcc	cagtctgcc	1740
gcttcaagag	ggtgcagcag	agacacgtcc	tggagtcgga	gaagaaccag	ctgctgcagc	1800
aagtcgacca	cctcaagcag	gagatctcca	ggctggtgcg	cagagaggac	gcgtacaagg	1860
agaaatacga	gaagttggtg	agcagcggct	tccgagaaaa	cggctcgagc	agcgacaacc	1920
cgtcctctcc	cagatTTTTT	atgtgagtct	gacacgcgat	tccagctagc	caccctgata	1980
agtgtctcgc	gggggtccgg	ctcgggtgtg	ggcttgctag	ttctagagcc	atgtctgcc	2040
ccacctcacc	acccccacc	ccaccgagtt	tggccccctt	ggccccctac	acacacacaa	2100
acccgcacgc	acacaccaca	cacacacaca	cacacacaca	cacacccac	accctgctcg	2160
agtttggtgt	ggtggtggct	gttttaaact	ggggagggaa	tgggtgtctg	gctcatggat	2220
tgccaatctg	aaattctcca	taacttgcta	gcttgTTTTT	TTTTTTTTTT	tacaccccc	2280
cgcgccaccc	ccggacttgc	acaatgttca	atgatctcag	cagagttctt	catgtgaaac	2340
gttgatcacc	tttgaagcct	gcatcattca	catatTTTTT	cttcttcttc	cccttcagtt	2400
catgaactgg	tgttcatttt	ctgtgtgtgt	gtgtgtttta	ttttgtttgg	atTTTTTTTT	2460
ttaattttac	tttttagagct	tgctgtgttg	cccacctttt	ttccaacctc	caccctcact	2520
ccttctcaac	ccatctcttc	cagatgaaa	gaaaaaaaaa	agcaaagttt	tttttcttc	2580
tcctgagttc	ttcatgtgag	attgagcttg	caaaggaaaa	aaaaatgtga	aatgttatag	2640

acttgcagcg	tgccgagttc	catcggggtt	tttttttagc	attggttatgc	taaaatagag	2700
aaaaaaaaatcc	tcatgaacct	tccacaatca	agcctgcac	aaccttcttg	gtgtgacttg	2760
tgagtttttg	ccttgatg	ccaaatctga	gagtttagtc	tgccattaaa	aaaactcatt	2820
ctcatctcat	gcattattat	gcttgctact	ttgtcttagc	aacaatgaac	tataactggt	2880
tcaaagactt	tatggaaaag	agacattata	ttaataaaaa	aaaaaagcct	gcatgctgga	2940
catgtatggt	ataattat	tttcctttt	tttcctttt	ggcttgga	tggacgttcg	3000
aagacttata	gcatggcatt	catactttt	ttttattgcc	tcatgacttt	tttgagttta	3060
gaacaaaaca	gtgcaaccgt	agagccttct	tcccatgaaa	ttttgcatct	gctccaaaac	3120
tgctttgagt	tactcagaac	ttcaacctcc	caatgcactg	aaggcattcc	ttgtcaaaga	3180
taccagaatg	ggttacacat	ttaacctggc	aaacattgaa	gaactcttaa	tgttttcttt	3240
ttaataagaa	tgacgcccc	ctttggggac	taaaattgtg	ctattgccga	gaagcagtct	3300
aaaatttatt	ttttaaaaag	agaaactgcc	ccattat	tggtttgttt	tatttttatt	3360
ttatat	tttttg	tcattgtcaa	atgtggaatg	ctctgggttt	ctagtatata	3420
atttaattct	agtttttata	atctgttagc	ccagttaaaa	tgtatgctac	agataaagga	3480
atgttataga	taaatttgaa	agagttaggt	ctgttagct	gtagat	taaacgattg	3540
atgcactaaa	ttgtttacta	ttgtgatggt	aaggggggta	gagtttgcaa	ggggactggt	3600
taaaaaaagt	agcttataca	gcatgtgctt	gcaacttaaa	tataagttgg	gtatgtgtag	3660
tcittgctat	accactgact	gtattgaaaa	ccaaagtatt	aagaggggaa	acgccctgt	3720
ttatatctgt	aggggtat	tacattcaaa	aatgtatggt	ttttttctt	ttcaaaatta	3780
aagtatttg	gactgaattg	cactaagata	taacctgcaa	gcatataata	caaaaaaaaa	3840
ttgcaaaact	gtttagaacg	ctaataaaat	ttatgcagtt	ataaaaatgg	cattactgca	3900
cagttttaag	atgatgcaga	tttttttaca	gttgattgt	ggtgcagaac	tggattttct	3960
gtaacttaaa	aaaaaatcca	cagttttaaa	ggcaataatc	agtaaagtgt	attttcaggg	4020
actgacatcc	tgtcttttaa	aagaaatgaa	aagtaaactc	taccacaata	aatataaaaa	4080
aatcttgtca	gttacttttc	ttttacatat	tttgctgtgc	aaaattgttt	tatatcttga	4140
gttactaact	aaccacgcgt	gttgttccta	tgtgcttttc	tttcattttc	aattctggtt	4200
atatcaagaa	aagaataatc	tacaataata	aacggcattt	ttttttgatt	ctgtactcag	4260
tttcttagtg	tacagtttaa	ctgggcccaa	caacctcggt	aaaagtgtaa	aatgcacct	4320
tttctccagt	ggaaggattc	ctggaggaat	aggagagacag	taattcaggg	tgaaattata	4380
ggctgttttt	tgaagtgagg	aggctggccc	catatactga	ttagcaatat	ttaatataga	4440
tgtaaattat	gacctcattt	ttttctcccc	aaagttttca	gttttcaa	gagttgagcc	4500
ataattgccc	ttggtaggaa	aaacaaaaca	aaacagtgga	actaggcttc	ctgagcatgg	4560

ccctacactt	ctgatcagga	gcaaagccat	ccatagacag	aggagccgga	caaatatggc	4620
gcatcagagg	tggcttgccg	acatatgcat	tgaacggtaa	agagaaacag	cgcttgccct	4680
ttcactaaag	ttgactatct	ttccttcctc	tcttacacac	cgagatcttc	ttgttagcaa	4740
ggcctgacaa	gatttaacat	aaacatgaca	aatcatagtt	gtttgttttg	ttttgctttt	4800
ctctttaaca	ctgaagatca	tttgtcttaa	ataggaaaaa	gaaaatccac	tccttacttc	4860
catatttcca	agtacatatc	tggtttaaac	tatgttatca	aatcatatct	caccgtgaat	4920
attcagtggg	gaacttctct	acctggatga	gctagtaatg	atttcagatc	atgctatccc	4980
cagaaaataa	agcaaaaaat	aatacctgtg	tggaaatatag	gctgtgcttt	gatttactgg	5040
tattttacccc	aaaataggct	gtgtatgggg	gctgacttaa	agatcccttg	gaaagactca	5100
aaactacctt	cactagtagg	actcctaagc	gctgacctat	ttttaaatga	cacaaattca	5160
tgaactaat	gttacaaatt	catgcagttt	gcactcttag	tcactctccc	ctagcacacc	5220
aatagaatgt	tagacaaagc	cagcactgtt	ttgaaaatac	agccaaacac	gatgactttt	5280
gttttgtttt	ctgccgttct	taaaagaaaa	aaagataata	ttgcaactct	gactgaaaga	5340
cttattttta	agaaaacagg	ttgtgttttg	tgctgctaag	ttctggccag	tttatcatct	5400
ggccttcctg	cctatttttt	acaaaacacg	aagacagtgt	gtaacctcga	cattttgacc	5460
ttccttttatg	tgctagttaa	gacaggctcc	tgaatccaca	cttaattttg	cttaacaaaa	5520
gtcttaatag	taaacctccc	ctcatgagct	tgaagtcaag	tgctcttgac	ttcagatatt	5580
tctttccctt	tttttttttt	ttctcatca	caactaagag	atacacaaac	tctgaagaag	5640
cagaaatgga	gagaatgctt	ttaacaaaaa	agcatctgat	gaaagatctt	aggcaaacat	5700
tctcaaaaata	agagtgtatat	tctggatgta	gttattgcag	ttatctcatg	acaaatgagg	5760
cctggatttg	aaggaaaata	tagttgtgta	gaattaaagca	ttttgatagg	aatctacaag	5820
gtagttgaat	ataataagca	ggtttggggc	cccaaacttt	agaaaatcaa	atgcaaagggt	5880
gctggcaaaa	atgaggtttg	agtggctggc	tgtaagagaa	ggttaactcc	tagtaaaagg	5940
cattttttaga	aataacaatt	actgaaaact	ttgaagtata	gtgggagtag	caaacaaata	6000
catgtttttt	ttttcttaca	aagaactcct	aaatcctgag	taagtgccat	tcattacaat	6060
aagtctctaa	atttaaaaaa	aaaaaaatca	tatgaggaaa	tctagctttc	ccctttacgc	6120
tgcgtttgat	ctttgtctaa	atagtgttaa	aattcctttc	attccaatta	cagaactgag	6180
cccactcgca	agttggagcc	atcagtggga	tacgccacat	tttggagacc	ccagcatcgt	6240
gtacttacca	gtgtgttcac	aaaatgaaat	ttgtgtgaga	gctgtacatt	aaaaaaaatc	6300
atcattatta	ttattatttg	cagtcattga	gaaccaccta	cccctgactt	ctgttttagtc	6360
tcctttttta	ataaaaaatta	ctgtgttaga	gaagaaggct	attaaatgta	gtagttaact	6420

atgcctcttg	tctgggggtt	tcatagagac	cggtaggaaa	gcgcāctcct	gcttttcgat	6480
ttatgggtgtg	tgcaagtaaa	caggtgcatt	gctttcaacc	tgccatacta	gttttaaaaa	6540
ttcactgaaa	ttacaaagat	acatatatat	gcatatatat	aatggaaagt	ttcccgaat	6600
gcaacaatta	gcattttaaa	atcatatata	ggcatgcaca	ttctaaatag	tactttttca	6660
tgcttcattg	tttctctggc	agataatfff	actaagaaga	aaaatagata	ttcgactccc	6720
cttccctaaa	caaatccacg	ggcagaggct	ccagcggagc	cgagccccct	ggttttctcg	6780
taggccctag	acgggtgttg	atftatcagt	gatgtcaaac	gtgctcattt	gtcagacata	6840
gctgtaaatg	aaaacaatgt	gtggcaaat	acaaagtt			6878

<210> 2

<211> 2656

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

gaggcttttaa	aatctttttt	catcttctag	ctgtagctcg	ggctgcttgt	cggcttggcc	60
ttccccctccc	ccctttgctc	tctgcctcgt	ctttccccag	gacttcgcta	ttttgctttt	120
ttaaaaaaag	gcaagaaaga	actaaactcc	cccctccctc	tcctccagtc	gggctgcacc	180
tctgccttg	actttgcaca	gaggtagaga	gcgcgcgagg	gagagagagg	aaagaaaaaa	240
aataataaag	agagccaagc	agaagaggag	gcgagaagca	tgaagtgtta	actccccgt	300
gccaaaggccc	gcgccgccc	gacagacgcc	cgccgcgcct	ccagccccga	gcggacgccg	360
cgcgcgccct	gcctgcagcc	cgggcccggc	aggcgagccc	ttccttatgc	aaagcgcgca	420
gcggagcggc	gagcggggga	cgccgcgcac	cgggcccggc	tcctccagct	tcgccgccgc	480
agccaccacc	gccgccaccg	cagctcgcgg	aggatcttcc	cgagcctgaa	gccgccggct	540
cggcgcgcaa	ggaggcgagc	gagcaaggag	gggcccgggg	gagcgaggga	gcacattggc	600
gtgagcaggg	gggagggagg	gcccggcgcg	ggggcgcggg	cagggcgggg	gggtgtgtgt	660
gtgagcgcgc	tcggagggtt	cgggccagcc	accgccgcgc	aagctagaag	cgccccagcc	720
cggcaagctg	gtcaccgcc	tgccaccca	gcacagccc	ctggccccct	tcctgcagcc	780
catctggcgg	agcggcgggc	gcccggcgcg	cggcggcagg	agaatggcat	cagaactggc	840
aatgagcaac	tcgacctgc	ccaccagtcc	cctggccatg	gaatatgtta	atgacttcga	900
tctgatgaag	tttgaagtga	aaaaggaacc	ggtgagagac	gaccgcatca	tcagccagt	960
cggccgtctc	atcgccgggg	gctcgtgtc	ctccaccccc	atgagcacgc	cgtgcagctc	1020
ggtgccccct	ttccccagct	tctcggcgcc	cagcccgggc	tcgggcagcg	agcagaaggc	1080
gcacctggaa	gactactact	ggatgaccgg	ctaccgcgag	cagctgaacc	ccgaggcgct	1140
gggcttcagc	cccaggagcg	cggtcgaggc	gctcatcagc	aacagccacc	agctccagg	1200

ES 2 798 107 T3

cggttcgat	ggctacgcgc	gcggggcgca	gcagctggcc	gcggcgggccg	gggcccgtgc	1260
cggcgcctcc	ttgggcggca	gcggcgagga	gatgggcccc	gccgccgccc	tgggtgtccgc	1320
cgtgatcgcc	gcggccgccc	cgcagagcgg	cgcgggcccc	cactaccacc	accaccacca	1380
ccacgccgcc	ggccaccacc	accacccgac	ggccggcgcg	cccggcgccc	cgggcagcgc	1440
ggccgcctcg	gccggtggcg	ctggggggcg	ggcgggcggt	ggccccggcca	gcgctggggg	1500
cggcgggcgc	ggcgggcgcg	gcggaggcgg	cggggggcgc	gcggggggcg	ggggcgccct	1560
gcacccgcac	cacgccgccc	gcggcctgca	cttcgacgac	cgtttctccg	acgagcagct	1620
ggtgaccatg	tctgtgcgcg	agctgaaccg	gcagctgcgc	ggggtcagca	aggaggaggt	1680
gatccggctg	aagcagaaga	ggcggaccct	gaaaaaccgc	ggctatgccc	agtccctgcc	1740
cttcaagagg	gtgcagcaga	gacacgtcct	ggagtcggag	aagaaccagc	tgctgcagca	1800
agtcgaccac	ctcaagcagg	agatctccag	gctggtgcgc	gagagggacg	cgtacaagga	1860
gaaatacgag	aagttggtga	gcagcggcct	ccgagaaaac	ggctcgagca	gcgacaaccc	1920
gtcctctccc	gagtttttca	taactgagcc	cactcgcaag	ttggagccat	cagtgggata	1980
cgccacatct	tggaaacccc	agcatcgtgt	acttaccagt	gtgttcacaa	aatgaaatct	2040
gtgtgagagc	tgtacattaa	aaaaaatcat	cattattatt	attatttgca	gtcatggaga	2100
accacctacc	cctgacttct	gttttagtct	ctttttaaat	aaaaattact	gtgttagaga	2160
agaaggctat	taaatgtagt	agttaactat	gcctcttgtc	tgggggtttc	atagagaccg	2220
gtaggaaagc	gcactcctgc	ttttcgattt	atggtgtgtg	caagtaaaca	ggtgcattgc	2280
tttcaacctg	ccatactagt	tttaaaaatt	cactgaaatt	acaaagatac	atatatatgc	2340
atatatataa	tggaaagtct	cccggaatgc	aacaattagc	atttttaaat	catatatagg	2400
catgcacatt	ctaaatagta	ctttttcatg	cttcattgtt	tctctggcag	ataattttac	2460
taagaagaaa	aatagatatt	cgactcccct	tccctaaaca	aatccacggg	cagaggctcc	2520
agcggagccg	agccccctgg	ttttctcgta	ggccctagac	ggtgttgcat	ttatcagtga	2580
tgtcaaacgt	gctcatttgt	cagacatagc	tgtaaatgaa	aacaatgtgt	ggcaaaatac	2640
aaagttaaaa	aaaaaa					2656

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

gaggctttta	aatctttttt	catcttctag	ctgtagctcg	ggctgcttgt	cggcttgccc	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	actcccccg	300
gccaaaggccc	gcgccgccc	gacagacgcc	cgccgcgcct	ccagccccga	gcggaacgcc	360
cgcgcgccct	gcctgcagcc	cgggcccggc	aggcgagccc	ttccttatgc	aaagcgcgca	420
gcggagcggc	gagcggggga	cgccgcgcac	cgggcccggc	tcctccagct	tcgccgccgc	480
agccaccacc	gccgccaccg	cagctcgcgg	aggatcttcc	cgagcctgaa	gccgccggct	540
cggcgcgcaa	ggaggcgagc	gagcaaggag	gggcccgggc	gagcgaggga	gcacattggc	600
gtgagcaggg	gggagggagg	gcgggcgcgg	ggggcgcggg	cagggcgggg	gggtgtgtgt	660
gtgagcgcgc	tcggaggttt	cgggccagcc	accgccgcgc	aagctagaag	cgccccagcc	720
cggcaagctg	gtcacccgc	tggccacca	gcacagccc	ctggccccct	tcctgcagcc	780
catctggcgg	agcggcggcg	gcggcggcgg	cgccgcgagg	agaatggcat	cagaactggc	840
aatgagcaac	tcggacctgc	ccaccagtcc	cctggccatg	gaatatgtta	atgacttcga	900
tctgatgaag	tttgaagtga	aaaaggaacc	ggtggagacc	gaccgcatca	tcagccagt	960
cggccgtctc	atcgccgggg	gctcgtctgc	ctccaccccc	atgagcacgc	cgtgcagctc	1020
ggtgccccct	tcccccagct	tctcggcgcc	cagcccgggc	tcgggcagcg	agcagaaggc	1080
gcacctggaa	gactactact	ggatgaccgg	ctaccgcgag	cagctgaacc	ccgaggcgct	1140
gggcttcagc	cccaggagac	cggtcgaggc	gtcatcagc	aacagccacc	agctccagg	1200
cggcttcgat	ggctacgcgc	gcggggcgca	gcagctggcc	gcggcgggcc	gggcccgtgc	1260
cggcgccctc	ttgggcggca	gcggcgagga	gatgggcccc	gccgcgcgcg	tggtgtccgc	1320
cgtgatcgcc	gcggccgcgc	cgagagcgcg	cgcgggcccc	cactaccacc	accaccacca	1380
ccacgcgcgc	ggccaccacc	accaccgcgc	ggccggcgcg	cccggcgccg	cgggcagcgc	1440
ggccgcctcg	gccggtggcg	ctggggggcg	ggcgggcggt	ggcccggcca	gcgctggggg	1500
cggcggcggc	ggcggcggcg	gcggaggcgg	cgggggcgcg	gcggggggcg	ggggcgccct	1560
gcacccgcac	cacgcgcgcg	gcggcctgca	cttcgacgac	cgcttctccg	acgagcagct	1620
ggtgaccatg	tctgtgcgcg	agctgaaccg	gcagctgcgc	ggggtcagca	aggaggaggt	1680
gatccggctg	aagcagaaga	ggcgaccct	gaaaaaccgc	ggctatgccc	agtcctgccg	1740
cttcaagagg	gtgcagcaga	gacacgtcct	ggagtcggag	aagaaccagc	tgctgcagca	1800
agtcgaccac	ctcaagcagg	agatctccag	gctgggtgcg	gagagggacg	cgtacaagga	1860
gaaatacgag	aagttggtga	gcagcggctt	ccgagaaaac	ggctcgagca	gcgacaaccc	1920
gtcctctccc	gagtttttca	tgtgagtctg	acacgcgatt	ccagctagcc	accctgataa	1980
gtgctccgcg	ggggtccggc	tcgggtgtgg	gcttgctagt	tctagagcca	tgctcgccac	2040
cacctcacca	ccccacccc	caccgagttt	ggcccccttg	gccccctaca	cacacacaaa	2100

cccgacgca	cacaccacac	acacacacac	acacacacac	acaccccaca	ccctgctcga	2160
gtttgtggtg	gtggtggctg	ttttaaaactg	gggaggggaat	gggtgtcttg	ctcatggatt	2220
gccaatctga	aattctccat	aacttgctag	cttggttttt	tttttttttt	acaccccccc	2280
gccccacccc	cggacttgca	caatgttcaa	tgatctcagc	agagtcttcc	atgtgaaacg	2340
ttgatcacct	ttgaagcctg	catcattcac	atattttttc	ttcttcttcc	ccttcagttc	2400
atgaactggg	gttcattttc	tgtgtgtgtg	tgtgttttat	tttgtttgga	tttttttttt	2460
taattttact	tttagagctt	gctgtgttgc	ccaccttttt	tccaacctcc	accctcactc	2520
cttctcaacc	catctcttcc	gagatgaaag	aaaaaaaaaa	gcaaagtttt	tttttcttct	2580
cctgagttct	tcatgtgaga	ttgagcttgc	aaaggaaaaa	aaaatgtgaa	atgttataga	2640
cttgacgcgt	gccgagttcc	atcgggtttt	tttttttagca	ttgttatgct	aaaatagaga	2700
aaaaaatcct	catgaacctt	ccacaatcaa	gcctgcatca	accttctggg	tgtgacttgt	2760
gagttttggc	cttgtgatgc	caaactctgag	agtttagtct	gccattaaaa	aaactcattc	2820
tcatctcatg	cattattatg	cttgctactt	tgtcttagca	acaatgaact	ataactgttt	2880
caaagacttt	atggaaaaga	gacattatat	taataaaaaa	aaaaagcctg	catgctggac	2940
atgtatggta	taattatttt	ttcctttttt	tttctttttg	gcttggaat	ggacgttcga	3000
agacttatag	catggcattc	atacttttgt	tttattgcct	catgactttt	ttgagtttag	3060
aacaaaacag	tgcaaccgta	gagccttctt	cccatgaaat	tttgcatctg	ctccaaaact	3120
gctttgagtt	actcagaact	tcaacctccc	aatgcactga	aggcattcct	tgtcaaagat	3180
accagaatgg	gttacacatt	taacctggca	aacattgaag	aactcttaat	gttttctttt	3240
taataagaat	gacgccccac	tttggggact	aaaattgtgc	tattgccgag	aagcagtcta	3300
aaattttattt	tttaaaaaga	gaaactgccc	cattattttt	ggtttgtttt	atttttattt	3360
tatatattttt	ggcttttggt	cattgtcaaa	tgtggaatgc	tctgggtttc	tagtatataa	3420
tttaattcta	gtttttataa	tctgttagcc	cagttaaaat	gtatgctaca	gataaaggaa	3480
tgttatagat	aaatttgaaa	gagttaggtc	tgttttagctg	tagatttttt	aaacgattga	3540
tgactaaat	tgtttactat	tgtgatgtta	aggggggtag	agtttgcaag	gggactgttt	3600
aaaaaaagta	gcttatacag	catgtgcttg	caacttaaat	ataagttggg	tatgtgtagt	3660
cttgctata	ccactgactg	tattgaaaac	caaagtatta	agaggggaaa	cgccctgtt	3720
tatatctgta	ggggtatttt	acattcaaaa	atgtatgttt	tttttctttt	tcaaaattaa	3780
agtatttggg	actgaattgc	actaagatat	aacctgcaag	catataatac	aaaaaaaaat	3840
tgcaaaactg	tttagaacgc	taataaaatt	tatgcagtta	taaaaatggc	attactgcac	3900
agttttaaga	tgatgcagat	ttttttacag	ttgtattgtg	gtgcagaact	ggattttctg	3960

ES 2 798 107 T3

taacttaaaa	aaaaatccac	agtttttaaag	gcaataatca	gtaaātgtta	ttttcagggg	4020
ctgacatcct	gtcttttaaaa	agaaatgaaa	agttaaattctt	accacaataa	atataaaaaa	4080
atcttgtcag	ttactttttct	tttacatatt	ttgctgtgca	aaattgtttt	atatcttgag	4140
ttactaacta	accacgcgtg	ttgttcctat	gtgcttttct	ttcattttca	attctgggta	4200
tatcaagaaa	agaataatct	acaataataa	acggcatittt	tttttgattc	tgtactcagt	4260
ttcttagtgt	acagtttaac	tgggcccaac	aacctcggtta	aaagtgtaaa	atgcatacctt	4320
ttctccagtg	gaaggattcc	tggaggaata	gggagacagt	aattcagggg	gaaattatag	4380
gctgtttttt	gaagttagga	ggctggcccc	atatactgat	tagcaatatt	taatatagat	4440
gtaaattatg	acctcatttt	tttctcccca	aagttttcag	ttttcaaagt	agttgagcca	4500
taattgccct	tggtaggaaa	aacaaaacaa	aacagtggaa	ctaggcttcc	tgagcatggc	4560
cctacacttc	tgatcaggag	caaagccatc	catagacaga	ggagccggac	aaatatggcg	4620
catcagaggt	ggcttgcgca	catatgcatt	gaacggtaaa	gagaaacagc	gcttgccctt	4680
tcactaaagt	tgactatfff	tccttcttct	cttacacacc	gagattttct	tgtagcaag	4740
gcctgacaag	atttaacata	aacatgacaa	atcatagtgt	tttgttttgt	tttgcttttc	4800
tctttaacac	tgaagatcat	ttgtcttaaa	taggaaaaag	aaaatccact	ccttacttcc	4860
atattttcaa	gtacatatct	ggtttaaaact	atgttatcaa	atcatatttc	accgtgaata	4920
ttcagtggag	aaattctcta	cctggatgag	ctagtaatga	tttcagatca	tgctatcccc	4980
agaaataaaa	gcaaaaaata	atacctgtgt	ggaatatagg	ctgtgctttg	atttactggg	5040
attttaccca	aaataggctg	tgtatggggg	ctgacttaaa	gatcccttgg	aaagactcaa	5100
aactaccttc	actagtagga	ctcctaagcg	ctgacctatt	tttaaattgac	acaaattcat	5160
gaaactaatg	ttacaaattc	atgcagtttg	cactcttagt	catcttcccc	tagcacacca	5220
atagaatggt	agacaaagcc	agcactgttt	tgaaaataca	gccaaacacg	atgacttttg	5280
ttttgttttc	tgccgttctt	aaaagaaaaa	aagataatat	tgcaactctg	actgaaagac	5340
ttatftttta	gaaaacaggt	tgtgttttgg	gctgctaagt	tctggccagt	ttatcatctg	5400
gccttcctgc	ctattttttta	caaaacacga	agacagtgtg	taacctcgac	attttgacct	5460
tcctttatgt	gctagttag	acaggtcct	gaatccacac	ttaatftttg	ttaacaaaag	5520
tcttaatagt	aaacctcccc	tcatgagctt	gaagtcaagt	gttcttgact	tcagatattt	5580
ctttcccttt	tttttttttt	tcctcatcac	aactaagaga	tacacaaact	ctgaagaagc	5640
agaaatggag	agaatgcttt	taacaaaaaa	gcatctgatg	aaagattftta	ggcaaacatt	5700
ctcaaaaata	gagtgatatt	ctggatgtag	ttattgcagt	tatctcatga	caaattgaggc	5760
ctggattgga	aggaaaatat	agttgtgtag	aattaagcat	tttgatagga	atctacaagg	5820
tagttgaata	taataagcag	gtttggggccc	ccaaactftta	gaaaatcaaa	tgcaaagggtg	5880

```

ctggcaaaaa tgaggtttga gtggctggct gtaagagaag gttaactcct agtaaaaggc 5940
atTTTTtagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag tgggagtagc aaacaaatac 6000
atgttttttt tttcttaca aagaactccta aatcctgagt aagtgccatt cattacaata 6060
agtctctaaa tttaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat ctagctttcc cttttacgct 6120
gcgtttgatc tttgtctaaa tagtgttaaa attcctttca ttccaattac agaactgagc 6180
ccactcgcaa gttggagcca tcagtgggat acgccacatt ttggaagccc cagcatcgty 6240
tacttaccag tgtgttcaca aaatgaaatt tgtgtgagag ctgtacatta aaaaaaatca 6300
tcattattat tattatttgc agtcatggag aaccacctac ccctgacttc tgtttagtct 6360
ccttttttaa taaaaattac tgtgttagag aagaaggcta ttaaattgtag tagttaacta 6420
tgcctcttgt ctggggggtt catagagacc ggtaggaaag cgcactcctg cttttcgatt 6480
tatggtgtgt gcaagtaaac aggtgcattg ctttcaacct gccatactag ttttaaaaat 6540
tcactgaaat tacaagata catatatatg catatatata atggaaagtt tcccggaatg 6600
caacaattag catttttaaaa tcatatatag gcatgcacat tctaaatagt actttttcat 6660
gcttcattgt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa aaatagatat tcgactcccc 6720
ttccctaaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc gagccccctg gttttctcgt 6780
agggccctaga cgggtgttgca tttatcagtg atgtcaaacg tgctcatttg tcagacatag 6840
ctgtaaatga aaacaatgtg tggcaaaata caaagttaaa aaaaaaa 6887

```

<210> 4

<211> 403

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

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

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

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

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

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

```

ES 2 798 107 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Pro His Tyr His His His His His 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 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
 <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 Gln Ser Gly
165 170 175

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

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

Ser Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly 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

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNip específico de c-MAF

	<400> 6	
	acggcucgag cagcgacaa	19
5	<210> 7 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ARNip específico de c-MAF	
	<400> 7	
15	cuuaccagug uguucacaa	19
	<210> 8 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> ARNip específico de c-MAF	
	<400> 8	
25	uggaagacua cuacuggaug	20
	<210> 9 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> ARNip específico de c-MAF	
35	<400> 9	
	auuugcaguc auggagaacc	20
	<210> 10 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> ARNip específico de c-MAF	
45	<400> 10	
	caaggagaaa uacgagaagu	20
	<210> 11 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> ARNip específico de c-MAF	
55	<400> 11	
	acaaggagaa auacgagaag	20
60	<210> 12 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

<220>

<223> ARNip específico de c-MAF

<400> 12

5 accuggaaga cuacuacugg 20

<210> 13

<211> 13878

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

aactatatat	taaacacctc	cggctctgaga	ggccgtgttg	ggtgtctttg	tcaggtgaag	60
aaagagaaga	aggctggtac	accttcccag	gaattctcac	tgaagaaaac	atctggattt	120
tttacatctc	ttgtgcaaaa	caaacaaaga	tttcattaag	tgatgtatat	tgttttccaa	180
ggaagaaacc	tgcagagaca	aaaacaaata	agcaaataat	tgaacaaaa	atatgataaa	240
cccccaaatt	cttccagtg	taatttactt	gttatcatgg	ttctctacaa	aggcagagat	300
cactaattac	aggtttttcc	agaattcaca	tttcacgtca	agatcatcca	atccaaacag	360
tgtacggaaa	gcclagggcc	ttcttcactt	tgccccctac	cccacccctac	acacacgccc	420
ccatctaaat	gatacccttg	gaaagaaacc	tacacatctc	atttgtctat	attttgcttc	480
ctccctcgcc	tcccggtaac	caaatgtgag	ttgttctcta	actgcactgg	agaatcagaa	540
tttattgtac	atatgtttgt	gttccactta	ataaaaaaac	ctatatatta	agataaactt	600
tgtagtaaat	tcatgaggta	agtgactatt	tatgctaatac	aggcagaaat	atattctcaa	660
gcataatgca	ttacataaat	ttgaatgtaa	aatgttcaat	tatgaagtaa	atacaggtaa	720
tgcaataaat	aaattacctc	taataaaaaat	tataaaagat	gtgccttgaa	agagagagcg	780
gctttaactt	acaactgtga	attgcttaaa	gagaaaagaa	ttaataaatg	ctgaattact	840
ctgatgatta	tttagcacat	aattcaccta	ttcataacga	ctcctagtaa	tcagactggt	900
gtttcacatc	ctccaacatg	aggcaagact	gtttcctcag	caattttgcc	cttatcagat	960
tatctcgtct	gattctatta	attttcttcc	atgaatctgc	taacagtgat	ttgtgattta	1020
cttaccctgc	taactgaaga	ctgttaaaaag	gatttatcta	acactggacc	taagaacagt	1080
gtacgcctta	tcgttcagtt	actctgaaga	actctttctc	aaatcaattt	agttggtttc	1140

ES 2 798 107 T3

atagtgaat	ttagtggaca	ctggttagtt	ctgccccata	aaatcagccc	ctaaacaaag	1200
agtccagaca	ccatacctga	tgcattcccat	tctattcaga	ttatggatgt	ctgattccaa	1260
catgatatat	ttgagttgct	ataactcaca	atcggggaaa	atataatcct	ttaagctttt	1320
aatctttgta	atttggacat	gaacaggggt	tttgtttttc	atttttgcat	gaagtcatta	1380
tgtatgtact	gacgtgaaac	tataattgtg	tttctgatgt	tactgtgtca	caatattcta	1440
tgcgatgtaa	cccatgtcct	cctccccctc	acaaatctcc	tataaatatt	cattgctttc	1500
aaaaacttta	atactactgg	tccgaattgg	tcaataatga	caaatgcatg	gtttctaaat	1560
tactgtatat	tgttctacag	agattactag	agtatatata	gcaaggggat	gttaagcagt	1620
aagaaaacac	agttcacatt	gtatttggat	tagattggct	tggatagaag	tgaacaaaac	1680
aatgttagca	aagaagtcta	aagacatgtg	gccactgtga	attgtacaga	atcaaaaacc	1740
tgaatagtac	tcattaaaat	gagagagctc	aattgttata	aaagaaatgc	tgctaacaga	1800
gaactgtaaa	tgtttagaca	cccctgtgaa	tcactaaata	ataatgtaaa	aaggataaaa	1860
atgagaatta	agttataagc	ctgagagcat	tactgtctaca	catctaaaaa	aataattctg	1920
atcctctctt	ttttttttcc	aagagaaaat	gggcgactat	aaaagacctt	gcaataagag	1980
aaataaaaaat	accatgtctt	cacagcagtg	tacataaata	aaccataaaa	atgtgcagat	2040
aataatatat	ttagctgccc	aaacatgggc	atttaatttc	tagaaatgat	atataacaat	2100
gtaacaatta	gatactcagc	catgaatgtg	tatggcacag	tcttcacat	tagcaaactt	2160
tgtgtataaa	atattattta	ttatttatta	taatactgct	ttcagaggca	atgatcatac	2220
cttacagctt	ttaacacaaa	tatgatgcaa	aaggattaaa	agtatatcat	aaacaaacaa	2280
taaattcttt	ctaaatacac	ttaaattcat	atttttacatg	aaaaatataa	acttcctaca	2340
tttgtgacta	ctgactttta	aaaagacctt	gaaaactatt	gttacgggca	atgttaaattg	2400
acataatgct	tatgtaattg	aaagtgtgga	ttttcctcta	aataaaactat	aatcccttaa	2460
cttcattact	agggaaaata	ttgttaaaga	gaaggaaagc	aaggggaattc	tgctaggttg	2520
cataaatatt	gacataatct	tcactctttc	ttccccaaac	tggtaataga	catagtttat	2580
tccacccaac	aaaatgctct	tataagacca	aaactaccct	tattaacaac	ttctctgcag	2640
tcacgatgaa	aagaaacact	acttgtctga	aaaataccga	cagcgctgcc	cttttcagat	2700
taggggtgtgc	ctacgaatct	tttgggaagt	cttccattaa	ggattcctgg	gtttgctgaa	2760
actgaagtct	actaggatca	gagaaattaa	cacaggtcta	atatggtgca	aggaacgagt	2820
gagagacacc	tgaggttata	aatagcaaag	catgctgcgg	ggtggggaag	accattctga	2880
agtgcaatgt	tcaagacgct	ggcttaatat	atgactaagt	gtcagaagtc	aggttttctg	2940
agaattactt	tccagataaa	caactttata	gcactgcact	taatcttact	tactagagac	3000
atctcattta	tcactgaatt	acaagtaact	ttaatcctat	tgatattgcc	ataaagcccg	3060

ttgaaaatcc atcctggcac ttttaaaggg tttggggccc tgttacatgg ggatcctctt	3120
gcaaaggctc cagccagaaa ttacaccccg aggggtgtctg tatcccttg cctctttgtc	3180
aacaatcaag gagaagagga ggggcaaaaa tgatctctgc atctgccagc actttcttcg	3240
gcccccttcc tatagggtcg ggttctccca cttcagtcaa actaactttg tgtgtctctt	3300
tcctcctccc aactgggta accagctgct tttcaattca tcgacaaaac tggacacgga	3360
tcaatttcaa ctgacctttg ccgaaagggtg gcgctgttga ggtaaaaacc aactcgctcc	3420
aacaatagtt tccactcttc gatccttttg caggcttttc agaatttttt ttttttttta	3480
atgcacccctc ctagcgtctc ccccttctca taaagtaaaa taaatacgat taaaaacacc	3540
aaatgcattt cattaattga aggaatcaac agtcccaact tctaagcaga cgggctggtc	3600
ttccaaaggc tgggtcgggt tcaggagctt tctctccaaa taaatctctg cttcttcgac	3660
ttgcctatcg ctttaaaatc ttagaaacag agttagttgt tggtttcctt cttttttctt	3720
tttctttttt atttcttttt tgcataaact tttagagaat caatctagaa atttgaacta	3780
cttattagca tttgcaactg ggggtggggg gagcagcctc cccacccca cccccactc	3840
tgcgtttccg gactagtctc agaaaccgcg gtttaaaatt taacccttcg agggtagctg	3900
gtgagggctg gggattgtt tttccccctt gctccctgcc acgatcaagt ccgaaataat	3960
taaaggaaac gtaaaagtgc aaagggcgcg cctgacctg ataaacagag gtcagatttc	4020
gtaaggggac gggtgagtgt gagtgtgtgt gtgtttgtgt gtgtgtgtgt aagagagaga	4080
gagagcgagc gcgcaatatg agtctcaaag gccaaactcc ggccagtcag gagccggaag	4140
gctgagcccg gctgacctga ctttgagctt ccccgaggtt atctcgcata ggcgctcgct	4200
ctgtccaagg gcacgcgacg ccagcgggca gccggctctc gtgaagaatg gcctctaaac	4260
aacttatatt acctcgttgt aaagagaggg ataaaatggg ctttccctct ccacggatgc	4320
ccagccttct gggcaggcgc atggccgggc ggcgcccagc ccgcagcccc gatccggaca	4380
ccccactgca tccctccctt cccggtccct tccccgcacg ggcgcccag agacggacaa	4440
agagttgggg ccaagtttga gcgccgggca cggccaggct caggggaagga aggtccccgg	4500
cagacacctg ggtaccagag ttggtgcgaq gaggaaaagc tgggagggca attcacaatc	4560
ctgggggttg agggcaggca ggggagggga atcaggccaa tcccagccga gtgagcccc	4620
agcgagctgg ggctccggat gggaggcctg tctcgcgctc caaagaaaag caaacgccc	4680
tcccaggctc gcccggttg ccgaagcccc tctggaaaaa ctcttcccc tcttacacca	4740
aactttgcgc cgggcctcgt tccctcccgg gtaggcagcg gcgcaggaag ggttaagcca	4800
gcccgtccca gctgacagtc agctgattgg gccctgattg acagctccga aaagtttcct	4860
tgtttctata ctattatgct aatcgcggcc gctctcgccg cctcccattg gcccgagtg	4920

ES 2 798 107 T3

ccagtcaatt	tctcatttgg	acctgacgtc	acgagtgcta	taaaactcag	caattgcttt	4980
aaactcttct	tgctggatca	gaggctttaa	aatctttttt	catcttctag	ctgtagctcg	5040
ggctgcttgt	cggtttggcc	tccccctccc	ccctttgctc	tctgcctcgt	ctttccccag	5100
gacttcgcta	ttttgctttt	ttaaaaaaag	gcaagaaaga	actaaactcc	ccctccctc	5160
tcctccagtc	gggctgcacc	tctgccttgc	actttgcaca	gaggtagaga	gcgcgcgagg	5220
gagagagagg	aaagaaaaaa	aataataaag	agagccaagc	agaagaggag	gcgagaagca	5280
tgaagtgtta	actccccgt	gccaaggccc	gcgccgcccg	gacagacgcc	cgccgcgcct	5340
ccagccccga	gcggacgccg	cgcgcgccct	gcctgcagcc	cgggccggcg	aggcgagccc	5400
ttccttatgc	aaagcgcgca	gcggagcggc	gagcggggga	cgccgcgcac	cgggccgggc	5460
tcctccagct	tcgccgccgc	agccaccacc	gccgccaccg	cagctcgcgg	aggatcttcc	5520
cgagcctgaa	gccgccggct	cggcgcgcaa	ggaggcgagc	gagcaaggag	gggccggggc	5580
gagcgagggga	gcacattggc	gtgagcaggg	gggagggagg	gcgggcgcgg	ggggcgcggg	5640
cagggcgggg	gggtgtgtgt	gtgagcgcgc	tcggaggttt	cgggccagcc	accgccgcgc	5700
aagctagaag	cgccccagcc	cggcaagctg	gtcaccgccg	tggccacca	gcacagcccc	5760
ctggccccct	tcctgcagcc	catctggcgg	agcggcgggc	gcggcgggcg	cggcggcagg	5820
agaatggcat	cagaactggc	aatgagcaac	tccgacctgc	ccaccagtcc	cctggccatg	5880
gaatatgtta	atgacttcga	tctgatgaag	tttgaagtga	aaaaggaacc	ggtggagacc	5940
gaccgcatca	tcagccagtg	cggccgtctc	atcgccgggg	gctcgtgttc	ctccaccccc	6000
atgagcacgc	cgtgcagctc	ggtgccccct	ttccccagct	tctcggcgcc	cagccccggc	6060
tcgggcagcg	agcagaaggc	gcacctggaa	gactactact	ggatgaccgg	ctaccgcag	6120
cagctgaacc	ccgaggcgct	gggtttcagc	cccaggagcg	cggtcagggc	gctcatcagc	6180
aacagccacc	agctccaggg	cggcttcgat	ggctacgcgc	gcggggcgca	gcagctggcc	6240
gcggcgggcg	gggcccgtgc	cggcgccctc	ttgggcggca	gcggcgagga	gatgggcccc	6300
gccgccgccg	tggtgtccgc	cgtgatcgcc	gcggccgccg	cgagagcgcg	cgcgggcccc	6360
cactaccacc	accaccacca	ccacgccgcc	ggccaccacc	accaccgcac	ggccggcgcg	6420
cccggcgccg	cgggcagcgc	ggccgcctcg	gccggtggcg	ctggggggcg	gggcccgggt	6480
ggccccggcca	gcgctggggg	cggcggcggc	ggcggcggcg	gcggaggcgg	cgggggcgcg	6540
gcggggggcg	ggggcgccct	gcaccgcac	cacgccgccg	gcggcctgca	cttcgacgac	6600
cgcttctccg	acgagcagct	ggtgaccatg	tctgtgcgcg	agctgaaccg	gcagctgcgc	6660
ggggtcagca	aggaggagg	gatccggctg	aagcagaaga	ggcggaccct	gaaaaaccgc	6720
ggctatgccc	agtcctgccg	cttcaagagg	gtgcagcaga	gacacgtcct	ggagtcggag	6780
aagaaccagc	tgctgcagca	agtcgaccac	ctcaagcagg	agatctccag	gctggtgcgc	6840

ES 2 798 107 T3

gagagggacg	cgtacaagga	gaaatacgag	aagttggtga	gcagcggctt	ccgagaaaac	6900
ggctcgagca	gcgacaaccc	gtcctctccc	gagtttttca	tgtgagtctg	acacgcgatt	6960
ccagctagcc	accctgataa	gtgctccgcg	ggggtccggc	tcgggtgtgg	gcttgctagt	7020
tctagagcca	tgctcgccac	cacctcacca	ccccacccc	caccgagttt	ggcccccttg	7080
gccccctaca	cacacacaaa	cccgcacgca	cacaccacac	acacacacac	acacacacac	7140
acaccccaca	ccctgctcga	gtttgtggtg	gtggtggctg	ttttaaaactg	gggaggggaat	7200
gggtgtctgg	ctcatggatt	gccaatctga	aattctccat	aacttgctag	cttggtttttt	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
tccaacctcc	accctcactc	cttctcaacc	catctcttcc	gagatgaaag	aaaaaaaaaa	7560
gcaaagtttt	tttttcttct	cctgagttct	tcatgtgaga	ttgagcttgc	aaaggaaaaa	7620
aaaaatgtga	atgttataga	cttgccagcgt	gccgagttcc	atcgggtttt	tttttttagca	7680
ttgttatgct	aaaatagaga	aaaaaatcct	catgaacctt	ccacaatcaa	gcctgcatca	7740
accttctggg	tgtgacttgt	gagttttggc	cttgtgatgc	caaacttgag	agtttagtct	7800
gccattaaaa	aaactcattc	tcatctcatg	cattattatg	cttgctactt	tgtcttagca	7860
acaatgaact	ataactgttt	caaagacttt	atggaaaaga	gacattatat	taataaaaaa	7920
aaaaagcctg	catgctggac	atgtatggta	taattatttt	ttcctttttt	tttccttttg	7980
gcttggaat	ggacgttcga	agacttatag	catggcattc	atacttttgt	tttattgcct	8040
catgactttt	ttgagtttag	aacaaaacag	tgcaaccgta	gagccttctt	cccatgaaat	8100
tttgcatctg	ctccaaaact	gctttgagtt	actcagaact	tcaacctccc	aatgcactga	8160
aggcattcct	tgtcaaagat	accagaatgg	gttacacatt	taacctggca	aacattgaag	8220
aactcttaat	gttttctttt	taataagaat	gacgccccac	tttggggact	aaaattgtgc	8280
tattgccgag	aagcagtcta	aaatttattt	tttaaaaaga	gaaactgccc	cattattttt	8340
ggtttgtttt	atttttattt	tatatatttt	ggcttttggg	cattgtcaaa	tgtggaatgc	8400
tctgggtttc	tagtatataa	tttaattcta	gtttttataa	tctgttagcc	cagttaaaat	8460
gtatgctaca	gataaaggaa	tgttatagat	aaatttgaaa	gagttaggtc	tgttttagctg	8520
tagatttttt	aaacgattga	tgactaaat	tgtttactat	tgtgatgtta	aggggggtag	8580
agtttgcaag	gggactgttt	aaaaaaaagta	gcttatacag	catgtgcttg	caacttaaat	8640
ataagttggg	tatgtgtagt	ctttgctata	ccactgactg	tattgaaaac	caaagtatta	8700

agaggggaaa	cgccccctgtt	tatatctgta	ggggtatattt	acattcaaaa	atgtatgttt	8760
ttttttcttt	tcaaaattaa	agtatttggg	actgaattgc	actaagatat	aacctgcaag	8820
catataatac	aaaaaaaaat	tgcaaaactg	tttagaacgc	taataaaatt	tatgcagtta	8880
taaaaatggc	attactgcac	agttttaaga	tgatgcagat	ttttttacag	ttgtattgtg	8940
gtgcagaact	ggattttctg	taacttaaaa	aaaaatccac	agttttaaag	gcaataatca	9000
gtaaatgtta	ttttcagggg	ctgacatcct	gtctttaaaa	agaaatgaaa	agtaaatctt	9060
accacaataa	atataaaaaa	atcttgtcag	ttacttttct	tttacatatt	ttgctgtgca	9120
aaattgtttt	atatcttgag	ttactaacta	accacgcgtg	ttgttcctat	gtgcttttct	9180
ttcattttca	attctgggta	tatcaagaaa	agaataatct	acaataataa	acggcatttt	9240
tttttgattc	tgtactcagt	ttcttagtgt	acagtttaac	tgggccaac	aacctcgta	9300
aaagtgtaaa	atgcatectt	ttctccagt	gaaggattcc	tggaggaata	gggagacagt	9360
aattcagggg	gaaattatag	gctgtttttt	gaagtgagga	ggctggcccc	atatactgat	9420
tagcaatatt	taatatagat	gtaaattatg	acctcatttt	tttctcccca	aagttttcag	9480
ttttcaaatg	agttgagcca	taattgccct	tggtaggaaa	aacaaaacaa	aacagtggaa	9540
ctaggcttcc	tgagcatggc	cctacacttc	tgatcaggag	caaagccatc	catagacaga	9600
ggagccggac	aaatatggcg	catcagaggt	ggcttgcgca	catatgcatt	gaacggtaaa	9660
gagaaacagc	gcttgccctt	tcactaaagt	tgactatttt	tccttcttct	cttacacacc	9720
gagattttct	tgttagcaag	gcctgacaag	atttaacata	aacatgacaa	atcatagtgt	9780
tttgttttgt	tttgcttttc	tctttaacac	tgaagatcat	ttgtcttaaa	taggaaaaag	9840
aaaatccact	ccttacttcc	atatttccaa	gtacatatct	ggtttaaaact	atgttatcaa	9900
atcatatttc	accgtgaata	ttcagtgag	aacttctcta	cctggatgag	ctagtaatga	9960
tttcagatca	tgctatcccc	agaaataaaa	gcaaaaaata	atacctgtgt	ggaatatagg	10020
ctgtgctttg	atttactggg	atttacccca	aaataggctg	tgtatggggg	ctgacttaaa	10080
gatcccttgg	aaagactcaa	aactaccttc	actagtagga	ctcctaagcg	ctgacctatt	10140
tttaaatgac	acaaattcat	gaaactaatg	ttacaaattc	atgcagtttg	cactcttagt	10200
catcttcccc	tagcacacca	atagaatggt	agacaaagcc	agcactgttt	tgaaaataca	10260
gccaaacacg	atgacttttg	ttttgttttc	tgccgttctt	aaaagaaaaa	aagataatat	10320
tgcaactctg	actgaaagac	ttatttttaa	gaaaacaggt	tgtgtttggg	gctgctaagt	10380
tctggccagt	ttatcatctg	gccttctctg	ctatttttta	caaaacacga	agacagtgtg	10440
taacctcgac	attttgacct	tcctttatgt	gctagtttag	acaggctcct	gaatccacac	10500
ttaattttgc	ttaacaaaag	tcttaatagt	aaacctcccc	tcatgagctt	gaagtcaagt	10560
gttcttgact	tcagatatatt	ctttcctttt	tttttttttt	tcctcatcac	aactaagaga	10620

tacacaaaact	ctgaagaagc	agaaatggag	agaatgcttt	taacaaaaaa	gcctctgatg	10680
aaagatttta	ggcaaacatt	ctcaaaataa	gagtgatatt	ctggatgtag	ttattgcagt	10740
tatctcatga	caaatgaggc	ctggattgga	aggaaaatat	agttgtgtag	aattaagcat	10800
tttgatagga	atctacaagg	tagttgaata	taataagcag	gtttgggccc	ccaaacttta	10860
gaaaatcaaa	tgcaaagggtg	ctggcaaaaa	tgaggtttga	gtggctggct	gtaagagaag	10920
gttaactcct	agtaaaaggc	atTTTTtagaa	ataacaatta	ctgaaaactt	tgaagtatag	10980
tgggagtagc	aaacaaatac	atgttttttt	tttcttaca	agaactccta	aatcctgagt	11040
aagtgccatt	cattacaata	agtctctaaa	tttaaaaaaa	aaaaaatcat	atgaggaaat	11100
ctagctttcc	cctttacgct	gcgtttgatc	tttgtctaaa	tagtgttaaa	attcctttca	11160
ttccaattac	agaactgagc	ccactcgcaa	gttggagcca	tcagtgggat	acgccacatt	11220
ttggaagccc	cagcatcggtg	tacttaccag	tgtgttcaca	aaatgaaatt	tgtgtgagag	11280
ctgtacatta	aaaaaaatca	tcattattat	tattatttgc	agtcattggag	aaccacctac	11340
ccctgacttc	tgtttagtct	ccttttttaa	taaaaaattac	tgtgttagag	aagaaggcta	11400
ttaaatgtag	tagttaacta	tgcctcttgt	ctgggggttt	catagagacc	ggtaggaaag	11460
cgcactcctg	cttttcgatt	tatggtgtgt	gcaagtaaac	agggtgcattg	ctttcaacct	11520
gccatactag	ttttaaaaaat	tcactgaaat	tacaagata	catatatatg	catatatata	11580
atggaaagtt	tcccggaatg	caacaattag	cattttaaaa	tcatatatag	gcattgcacat	11640
tctaaatagt	actttttcat	gcttcattgt	ttctctggca	gataatttta	ctaagaagaa	11700
aaatagatat	tcgactcccc	ttccctaacc	aaatccacgg	gcagaggctc	cagcggagcc	11760
gagccccctg	gttttctctg	aggccctaga	cggtgttgca	tttatcagtg	atgtcaaacg	11820
tgctcatttg	tcagacatag	ctgtaaatga	aaacaatgtg	tggcaaaata	caaagttagt	11880
taaatacaca	ccctctgtgt	gattttttgc	tcccttttct	tttttgctcc	tactcaaaaa	11940
aaaaaaaaatc	acctccttta	catttccttg	gcttcttgca	tgtttccctt	ttcaaaaacc	12000
atgtaataat	tttttacaat	gtatctgaca	cattaatata	ttgacatcaa	ataggcagac	12060
attctacttt	tgcttgga	ataaatctgc	tacggagaca	tcatttcctc	actgtctcaa	12120
agccataact	acctgggagt	ctttcaacac	agacccctcc	gatgggaaat	gctgtttatt	12180
actgaatgca	ggatgctcac	gctctgatct	tttctccctt	gtgcctttac	cccagtcatt	12240
tttacttagc	aacaccaatt	ctagatactt	ctgttctgaa	gtagaaccac	ccccttgcca	12300
cactgccagt	tttcttgcta	aaagcagtgg	acagaagaca	gatcatggtc	accctcacia	12360
acatggcaca	cagctgtctc	ggtagctgca	ttcccagcat	gtcctggctc	aaatatctag	12420
agttgcctat	gacacgttca	aaggttccca	agcacagtac	attgggaggc	ttttgctgct	12480

gtggccggttg	ttttcgttta	ggccaactta	cttccgtatt	cacaāactct	tggttttacg	12540
aaatacactc	ctccagtcta	ctaggccaat	caatatat	aaaagtctga	ttgccacata	12600
agtctctctc	tctctctttt	tgttttttgt	ttgtttgttt	ttttctgttt	tggtgcccgg	12660
tagttaaaga	ctgagatagg	ttggaagact	aaaatacagg	agtacatgag	tgacaacctt	12720
cagccgtctg	atttccatgc	cggtaaaaca	cacaaccaag	ctcttcttag	cgctgcta	12780
ataaacattc	actaagaggg	aataggaagt	gagattttacc	agcttcactt	tgctgatttg	12840
caaggttccc	cactacgatt	cactgtcatt	tgatttttga	aaaataat	tgtccgtctc	12900
tttgaagaaa	tgtcttagtt	cttttat	gtttgtttgg	tttttttag	agaagtttta	12960
tctgcagtga	taggctacaa	tttttatctc	cgctgattat	ttgtcaggat	gctgaatgaa	13020
taatttggtc	ctgtgccttc	cttgttggtc	tgaggaaaat	aagagaaact	tggaagtttg	13080
tttactctt	agcccatcct	aatctaaaa	gaagatgtcc	caggtccagg	caggccatgt	13140
agtagttata	aaggaggtgg	tccaggtcca	gccacctcaa	tcaggatttg	tttgttttga	13200
agcatttgct	taaaagcgga	gcaagagtct	taacccaact	tgccataaca	ctgcttttct	13260
cgcttttgat	gtaaatcttc	aaaattcaga	catcaaacag	ccccagaaaa	ggggaattct	13320
ctccaggcat	tgctccgccc	cagctcctga	acaaaccag	ctctgtctag	catttttttc	13380
cctagcgggg	gtaggggaca	gggtgagaga	atttcagtct	cccaggctgt	ctcatgattg	13440
ttagggcata	aagaaacaca	gtcctgccac	aaattgggag	catctttacc	ctttagagag	13500
aaacaaaaca	aaactaaaca	aacaaatcaa	attgctttgc	atgaaggcgt	agcaaataaa	13560
atctcgggct	ccctgttccc	tgcaccattt	gtaggaggtg	agaaatgagg	gaaacaagag	13620
aaaggggaac	tttaaaagcg	ggaggcccag	aaataatccc	tgttaccagt	ctgaatttca	13680
cttgctccgt	ggctaacgtc	agacctagt	tgcatgtatg	ccagaagtaa	actaggctcg	13740
gctgtccatt	tctttaaaat	atgttcacat	gtttcccttt	tgaaaacaat	tttggggact	13800
aaacccaaat	ggagagattt	gaggaaatcg	ttaatgtctt	aacatttgag	tatatttata	13860
aatgtatcag	tctgtgat					13878

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para predecir metástasis ósea de un cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) en un sujeto que padece dicho cáncer que comprende
5
i) determinar el nivel de expresión, o amplificación del gen c-MAF en una muestra de dicho sujeto y
10
ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de referencia o la amplificación obtenida en la etapa i) con un número de copias de gen de referencia,
15
en el que el nivel de expresión incrementado de dicho gen con respecto a dicho valor de referencia o amplificación incrementada de dicho gen con respecto a un número de copias de gen de referencia es indicativo de riesgo incrementado de desarrollar metástasis ósea.
2. Método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) que comprende
20
i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF o amplificación en una muestra de dicho sujeto y
25
ii) comparar el nivel de expresión obtenido en i) con un valor de referencia, o la amplificación obtenida en i) con un número de copias de referencia,
30
en el que
- si el nivel de expresión está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, o la amplificación es amplificación incrementada con respecto a dicho número de copias de gen de referencia, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia para prevenir y/o tratar metástasis ósea,
35
- si el nivel de expresión no está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, o la amplificación no está incrementada con respecto a dicho número de copias de gen de referencia, entonces dicho sujeto no es susceptible de recibir una terapia para prevenir y/o tratar metástasis ósea.
3. Método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que un nivel de expresión de dicho gen por encima del promedio es indicativo de un riesgo incrementado de metástasis ósea y este riesgo es proporcional a los niveles de expresión de c-MAF.
4. Método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto con cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) con metástasis ósea que comprende
40
i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF, o amplificación en una muestra de metástasis ósea de dicho sujeto y
45
ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa (i) con un valor de referencia, o la amplificación obtenida en la etapa (i) con un número de copias de gen de referencia,
50
en el que
- si el nivel de expresión del gen c-MAF está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, o la amplificación del gen c-MAF está incrementada con respecto a dicho número de copias de gen de referencia, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia para prevenir la degradación ósea,
55
- si el nivel de expresión del gen c-MAF no está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, o la amplificación del gen c-MAF no está incrementada con respecto a dicho número de copias de gen de referencia, entonces dicho sujeto no es susceptible de recibir una terapia para prevenir la degradación ósea.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4, en el que la terapia destinada a prevenir y/o tratar 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 doble de MET y VEGFR2, un modulador de receptor de estrógeno, calcitonina y un inhibidor de catepsina K y/o la terapia destinada a prevenir y/o tratar metástasis ósea se selecciona del grupo que consiste en un agente inhibidor de c-MAF, un inhibidor de mTor, un inhibidor de cinasa Src, un inhibidor de COX-2, un antagonista de CCR5 y/o dicloruro de radio-223.
6. Método según la reivindicación 5, en el que el inhibidor de RANKL se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo específico de RANKL, un nanocuerpo específico de RANKL y osteoprotegerina.

7. Método *in vitro* para predecir metástasis ósea de un cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), en un sujeto que padece dicho cáncer que comprende determinar si el gen c-MAF está amplificado en una muestra de dicho sujeto en relación con un número de copias de gen de referencia en el que una amplificación del gen c-MAF con respecto a dicho número de copias de gen de referencia es indicativo de riesgo incrementado de desarrollar metástasis ósea.
8. Método *in vitro* para predecir metástasis ósea de un cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) en un sujeto que padece dicho cáncer que comprende determinar si el gen c-MAF está translocado en una muestra de dicho sujeto, en el que una translocación del gen c-MAF es indicativa de un riesgo incrementado de metástasis ósea.
9. Método *in vitro* para predecir el resultado clínico de un paciente que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) que comprende determinar si el gen c-MAF está amplificado en una muestra de dicho sujeto en relación con un número de copias de gen de referencia en el que una amplificación del gen c-MAF con respecto a dicho número de copias de gen de referencia es indicativo de un mal resultado clínico.
10. Método *in vitro* para predecir el resultado clínico de un paciente que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), que comprende determinar si el gen c-MAF está translocado en una muestra de dicho sujeto en el que una translocación del gen c-MAF es indicativa de un mal resultado clínico.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 y 10, en el que el locus 16q23 o 16q22-q24 está translocado.
12. Agente inhibidor de c-MAF para su uso en el tratamiento o la prevención de metástasis ósea de cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), en el que dicho agente inhibidor de c-MAF se selecciona del grupo que consiste en un ARNip específico de c-MAF, un oligonucleótido antisentido específico de c-MAF, una ribozima específica de c-MAF, un nanocuerpo o anticuerpo de inhibidor de c-MAF, una variante de c-MAF dominante negativa, un compuesto de la tabla 1 o de la tabla 2, ARN catalítico, una enzima de ADN, un péptido inhibidor, una molécula pequeña específica de c-MAF, un anticuerpo específico de c-MAF, una molécula de tipo anticuerpo específico de c-MAF, un péptido estructuralmente limitado (cíclico) específico de c-MAF, un péptido grapado específico de c-MAF o un alfacuerpo específico de c-MAF.
13. Agente capaz de evitar o prevenir la degradación ósea para su uso en el tratamiento de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), y que tiene niveles de c-MAF elevados en una muestra de metástasis con respecto a una muestra de control, en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, un inhibidor de PTH o PTHLH o un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor doble de MET y VEGFR2, un modulador de receptor de estrógeno, calcitonina, radio-223 y un inhibidor de catepsina K.
14. Método *in vitro* para tipificar una muestra de un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), comprendiendo el método:

(a) cuantificar el nivel de expresión o amplificación de c-MAF en una muestra proporcionada a partir de un paciente;

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

en donde dicha tipificación proporciona información pronóstica en relación con el riesgo de metástasis ósea en dicho sujeto.
15. Agente que previene o reduce la metástasis ósea para su uso en la prevención de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), en el que dicho sujeto se ha identificado que tiene un nivel de expresión de c-MAF incrementado en una muestra con respecto a un valor de referencia y en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en un agente inhibidor de c-MAF, un inhibidor de mTor, un inhibidor de cinasa Src, un inhibidor de COX-2, un antagonista de CCR5 y/o dicloruro de radio-223.
16. Agente inhibidor de c-MAF para su uso en el tratamiento de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal), y que tiene niveles de c-MAF elevados en una muestra de metástasis con respecto a una muestra de control.
17. Método según la reivindicación 2, en el que la terapia usada para tratar o prevenir la metástasis ósea es un inhibidor de mTor.

18. Método según la reivindicación 2, en el que la terapia usada para tratar o prevenir la metástasis ósea es un inhibidor de cinasa Src.
- 5 19. Método según la reivindicación 2, en el que la terapia usada para tratar o prevenir la metástasis ósea es un inhibidor de COX-2.
20. Método según la reivindicación 2, en el que la terapia usada para tratar o prevenir la metástasis ósea es Alpharadin.
- 10 21. Método *in vitro* para predecir el resultado clínico de un paciente que padece cáncer de mama triple negativo (incluyendo de tipo basal) con metástasis ósea, que comprende
 - i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de dicho sujeto y
 - 15 ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de referencia,en el que un nivel de expresión incrementado de dicho gen con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de un mal resultado clínico.

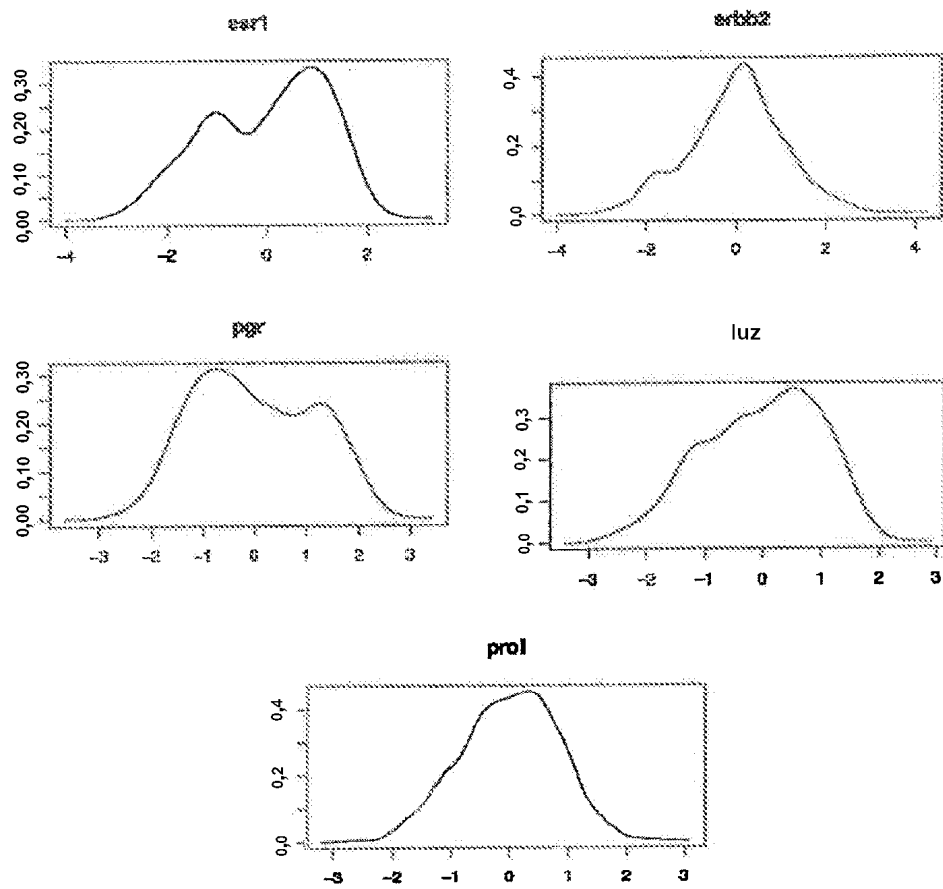


Figura 1

Tumores primarios de cáncer de mama humano triple negativo (n=164)

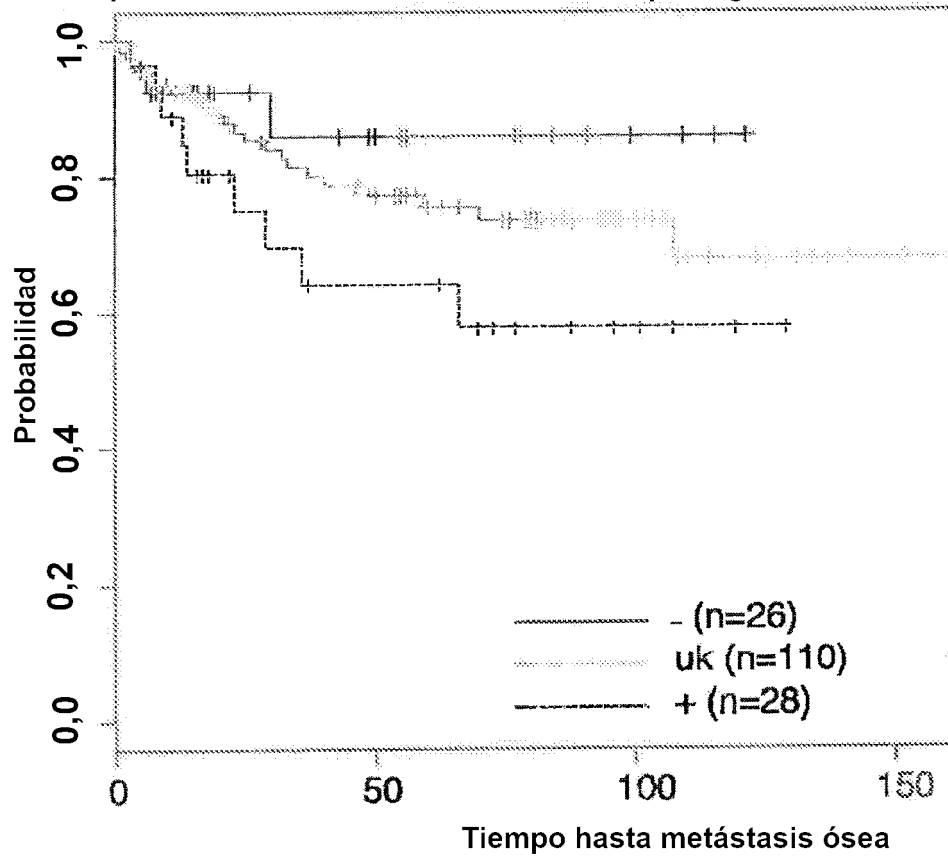


Figura 2

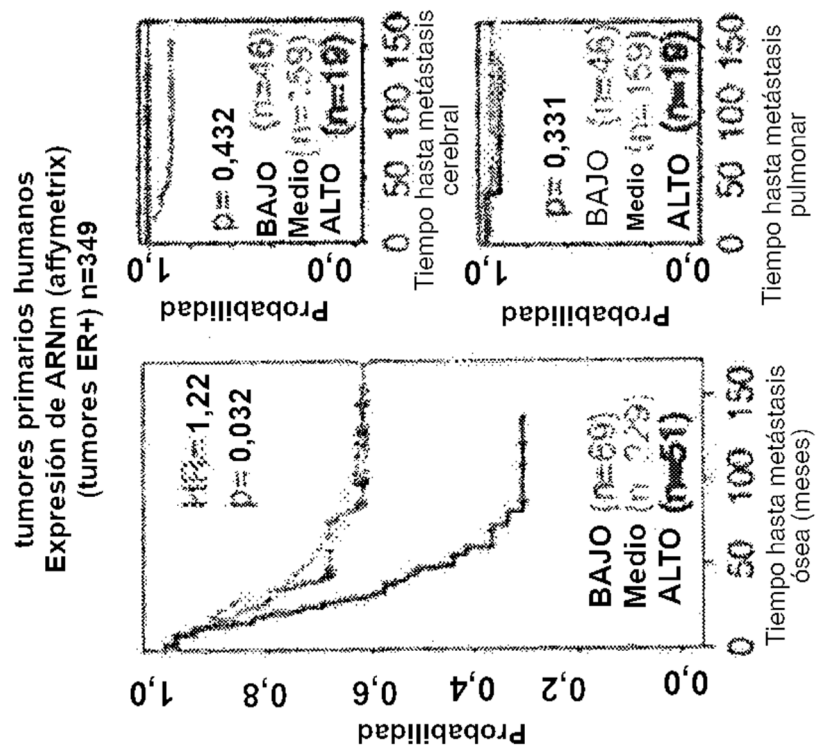


Figura 3

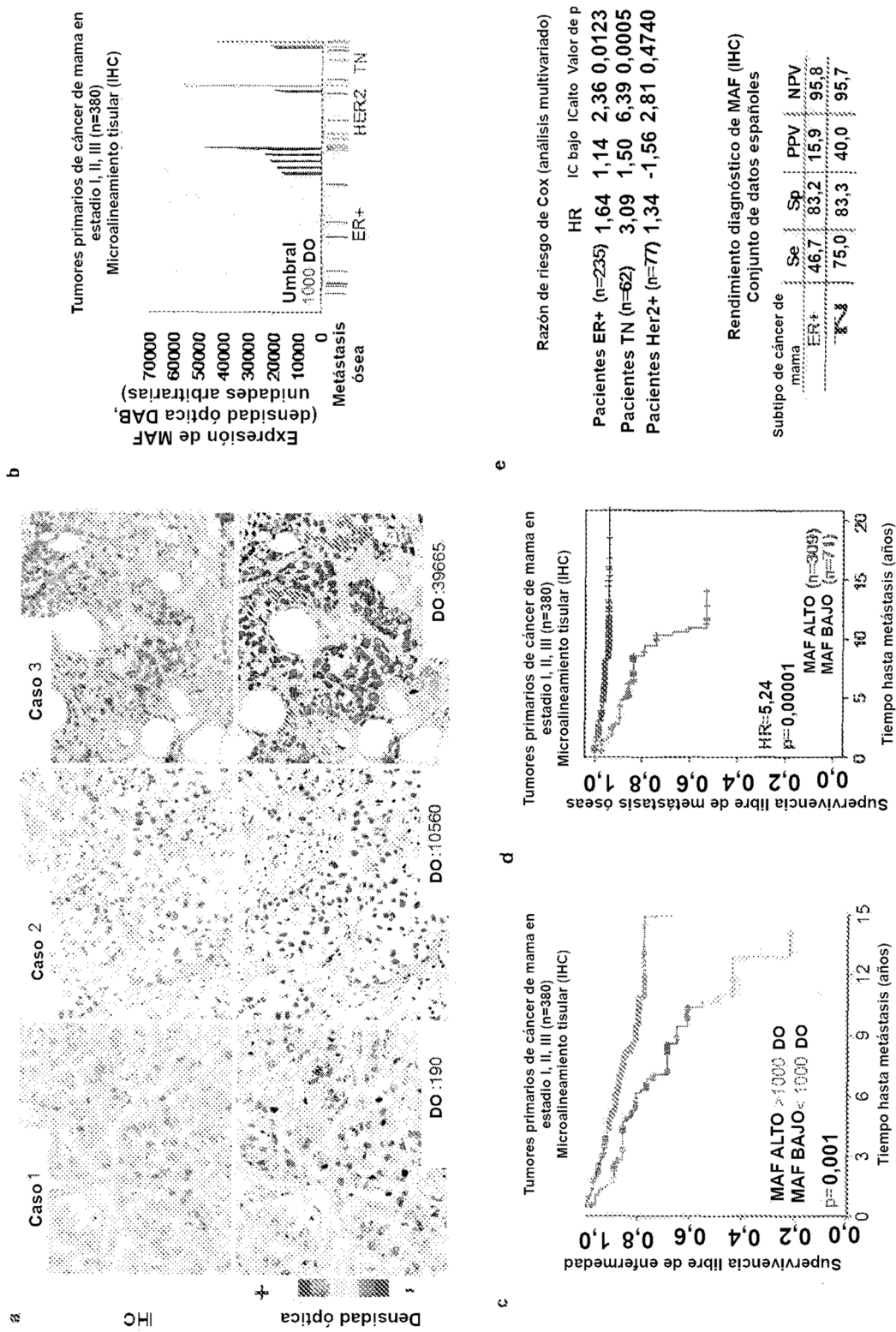


Figura 4

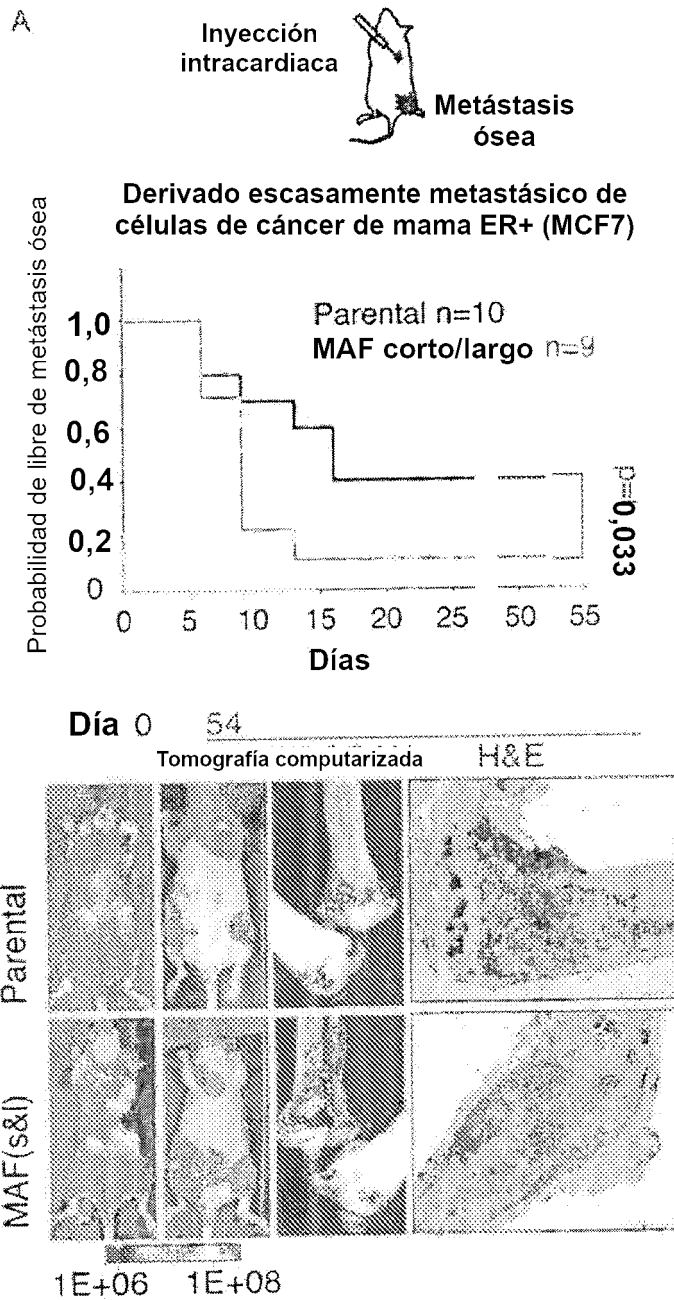


Figura 5A

B

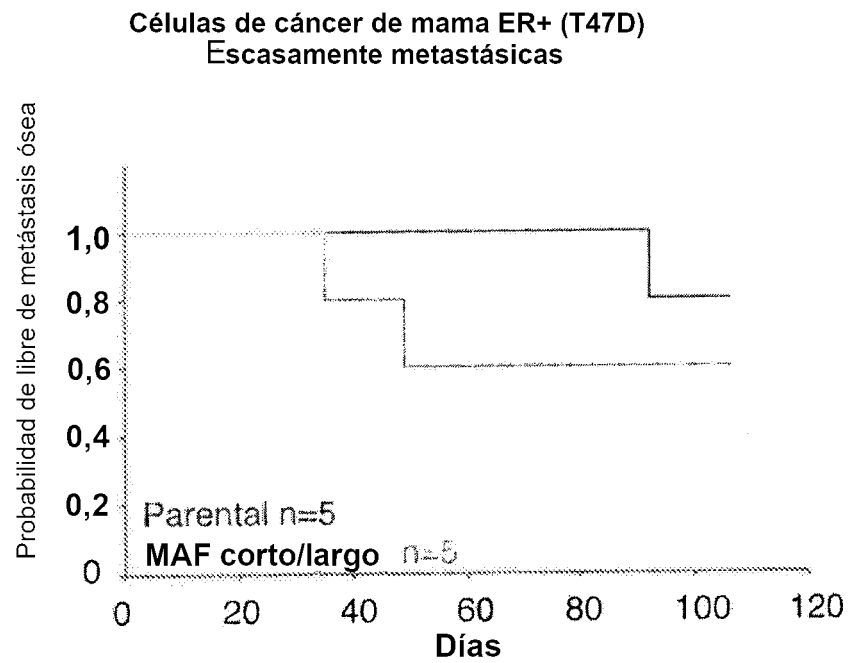


Figura 5B

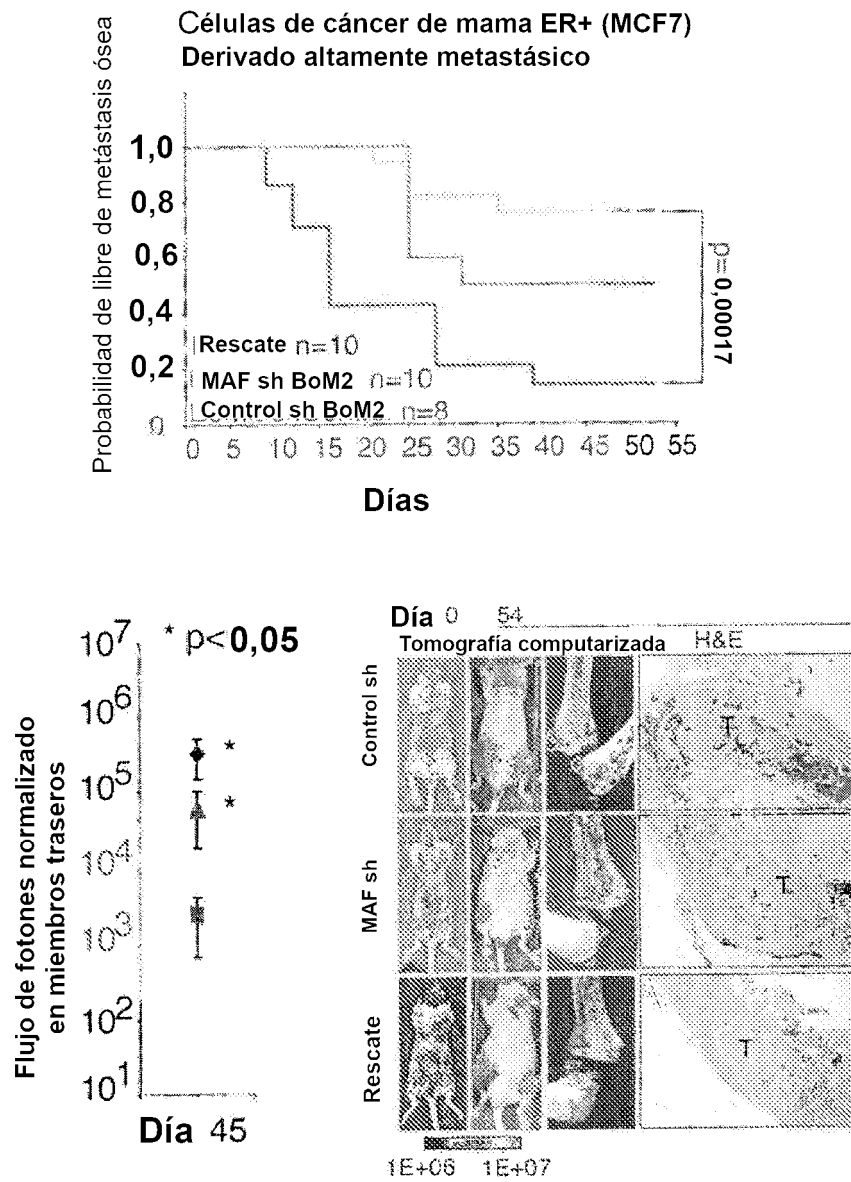


Figura 5C

Células de cáncer de mama ER+ (MCF7)
Escasamente metastáticas

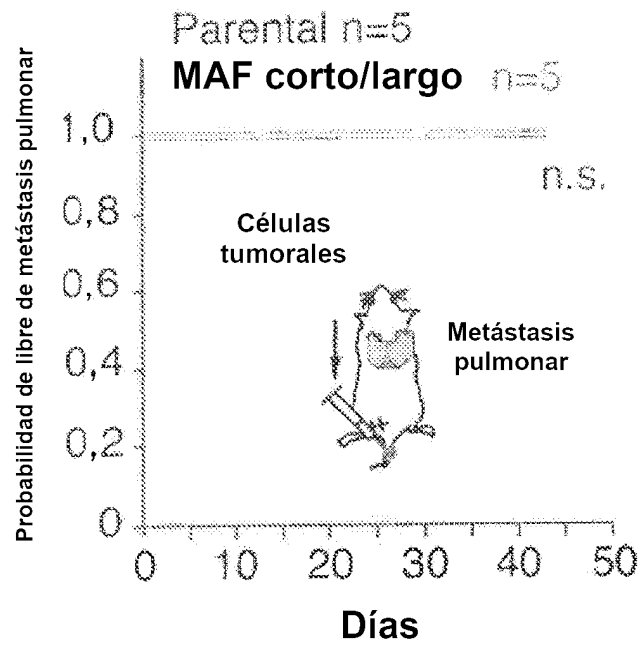


Figura 5D

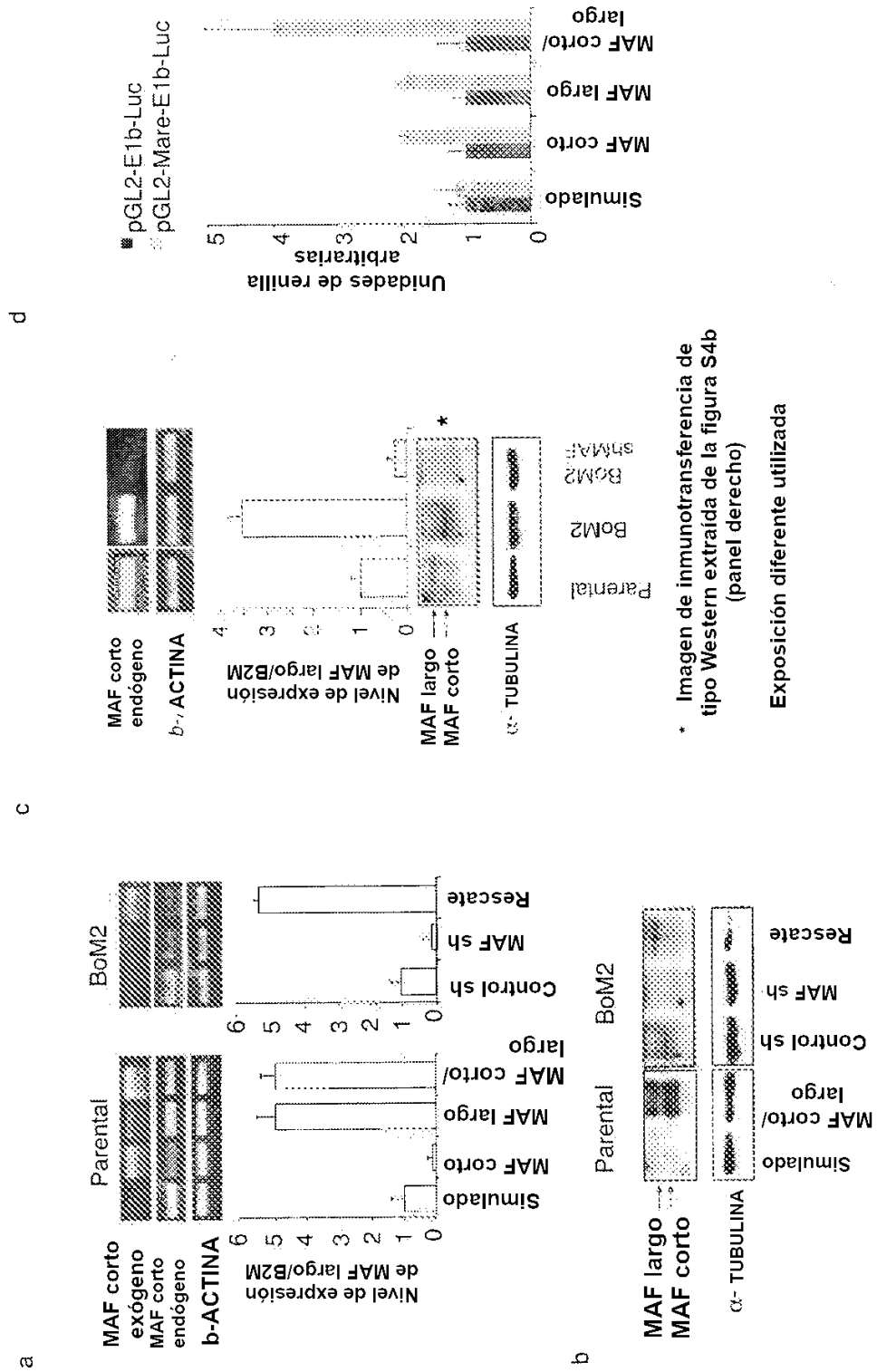


Figura 6

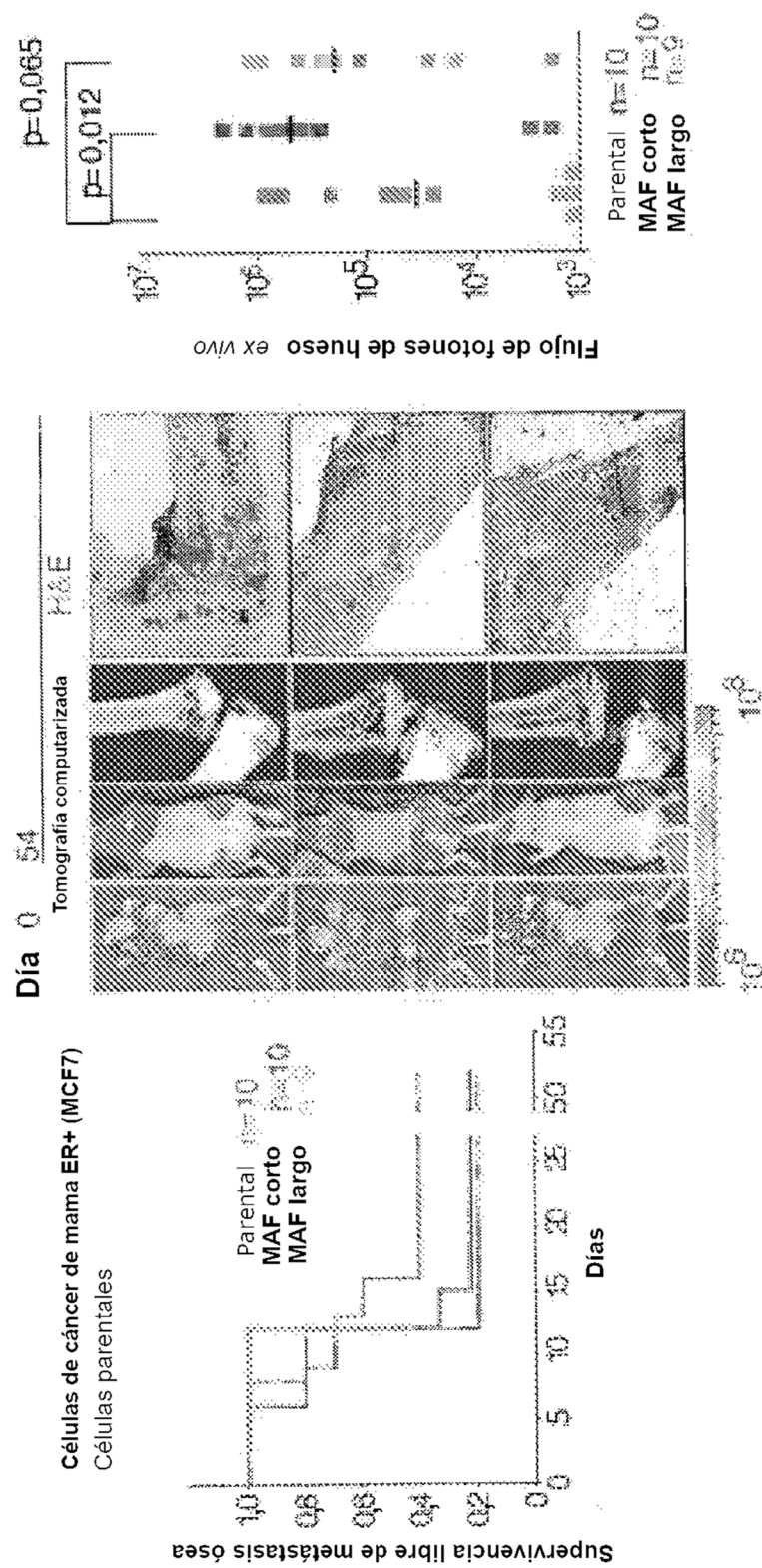


Figura 7

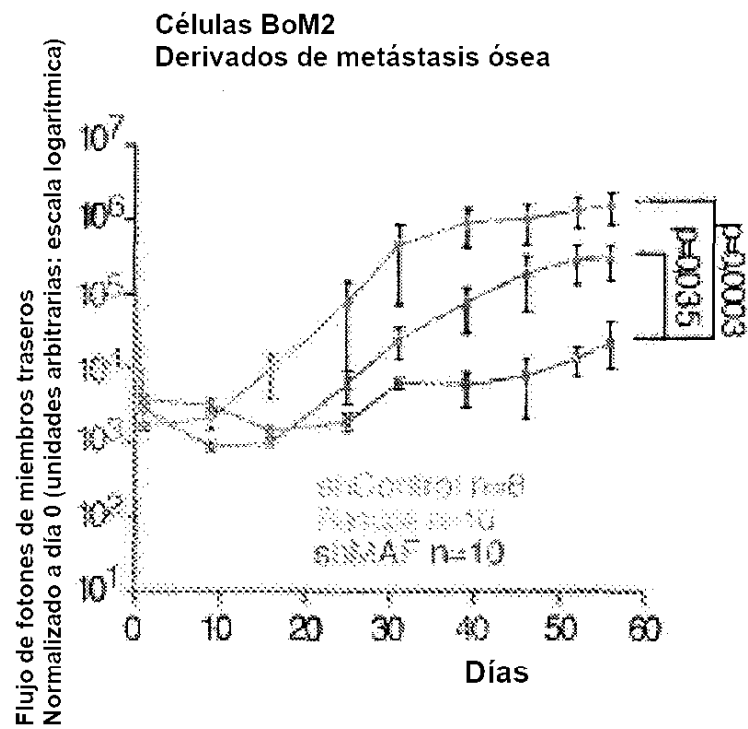
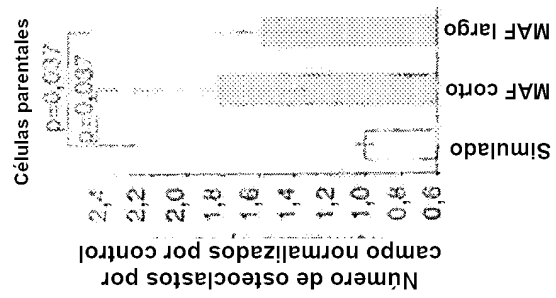
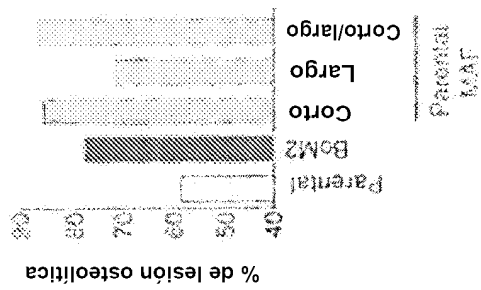


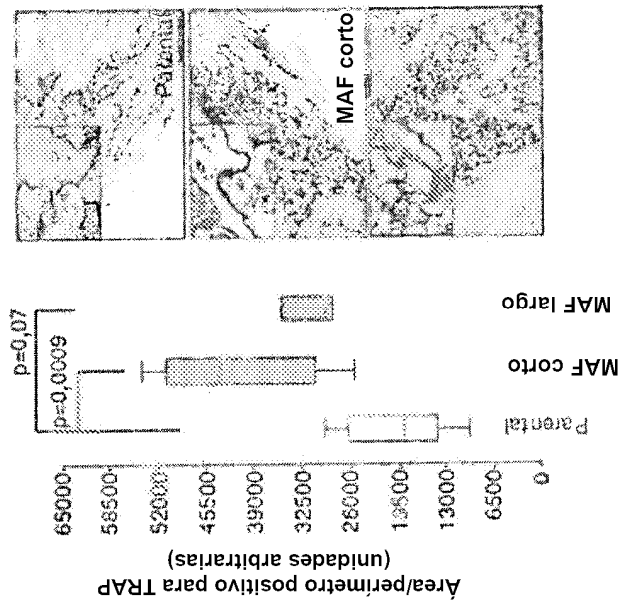
Figura 8



2



2



2

Figura 9

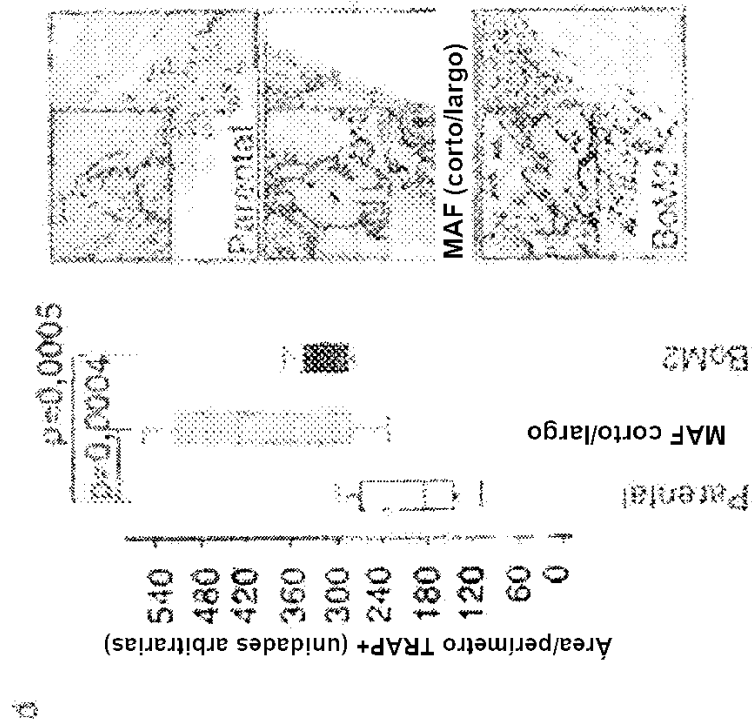


Figura 9

Inyección
subcutánea

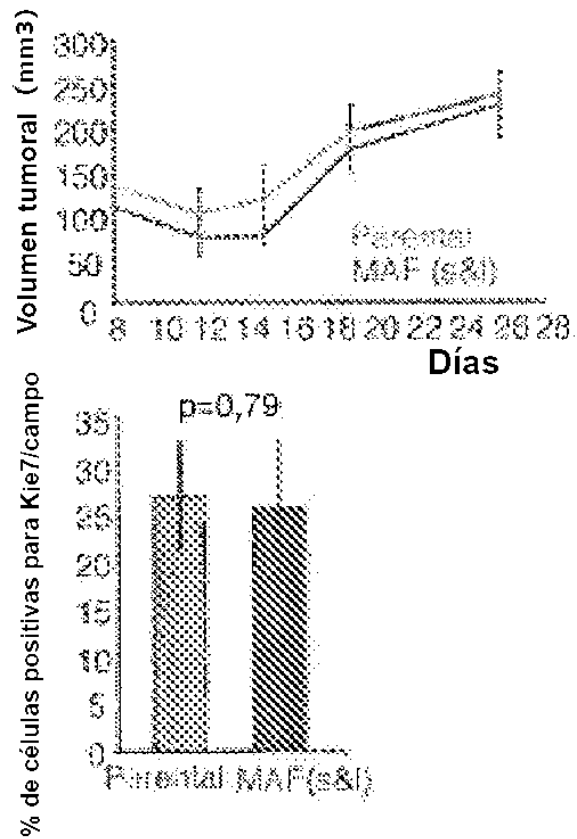
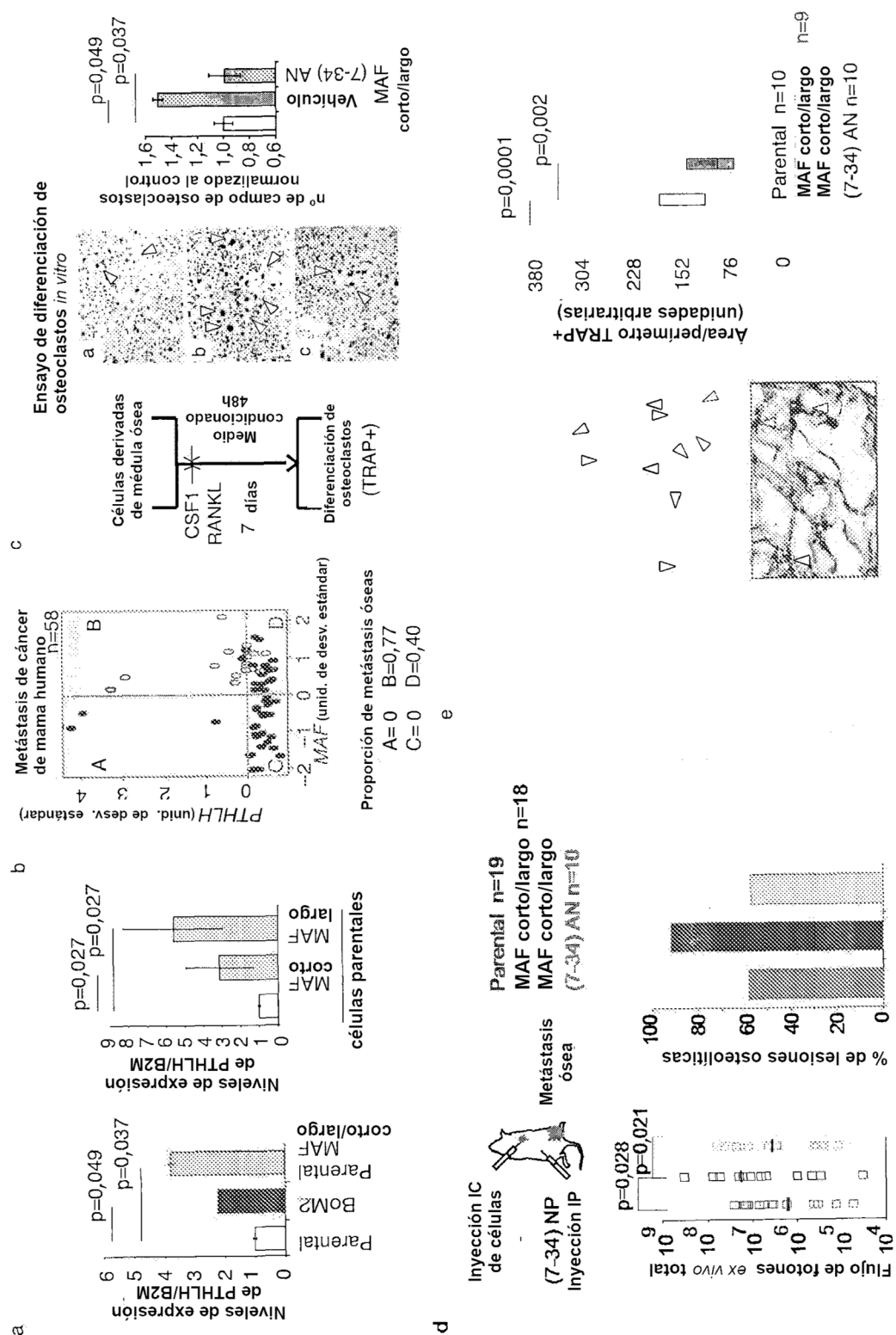


Figura 10



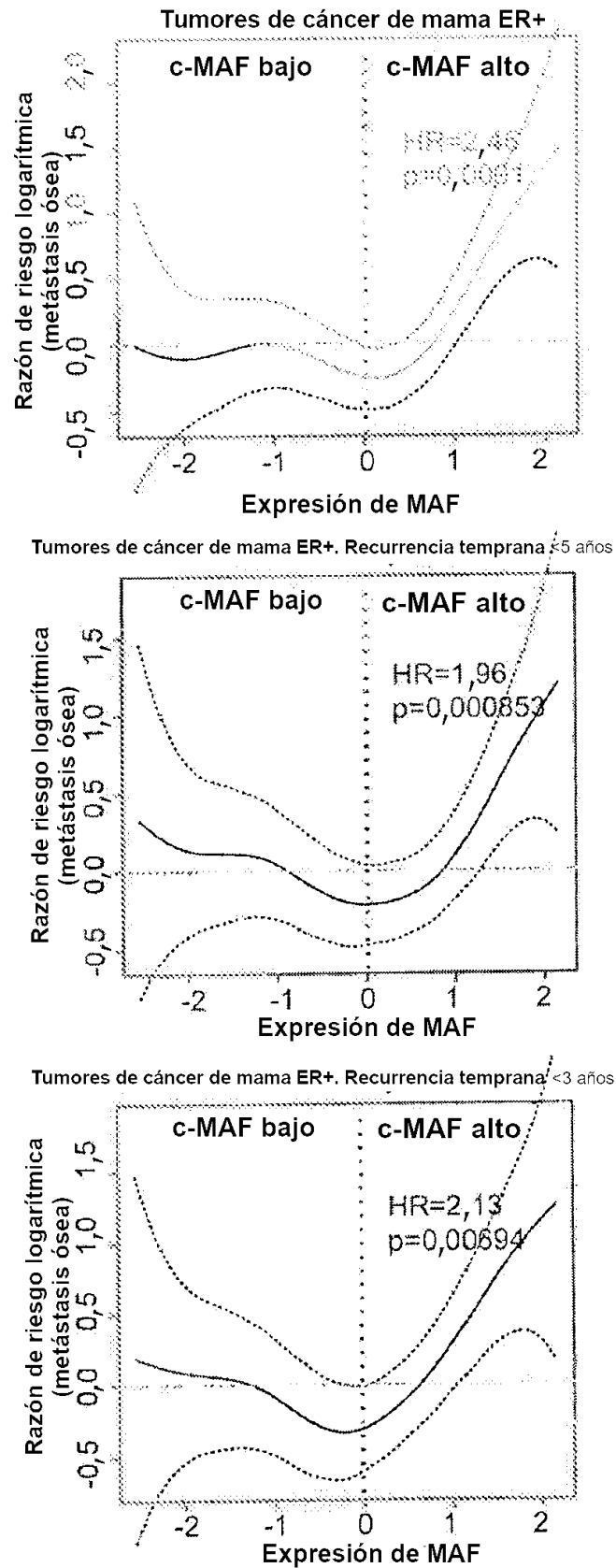


Figura 12

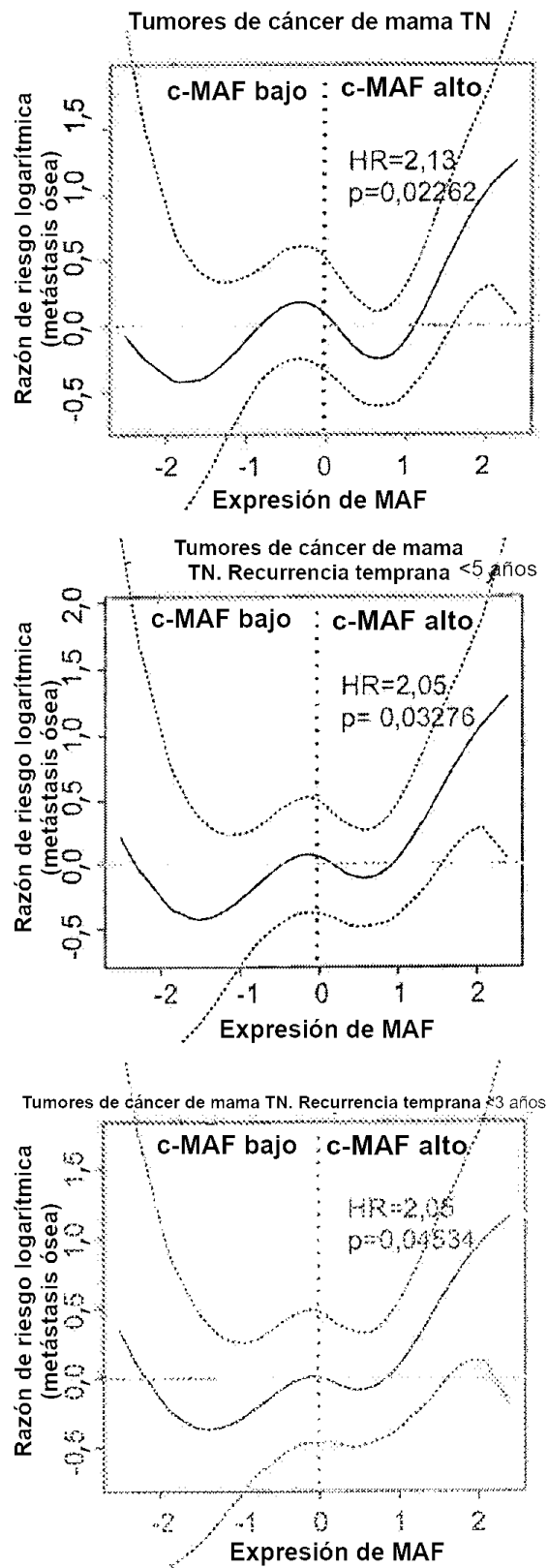


Figura 12 (cont.)

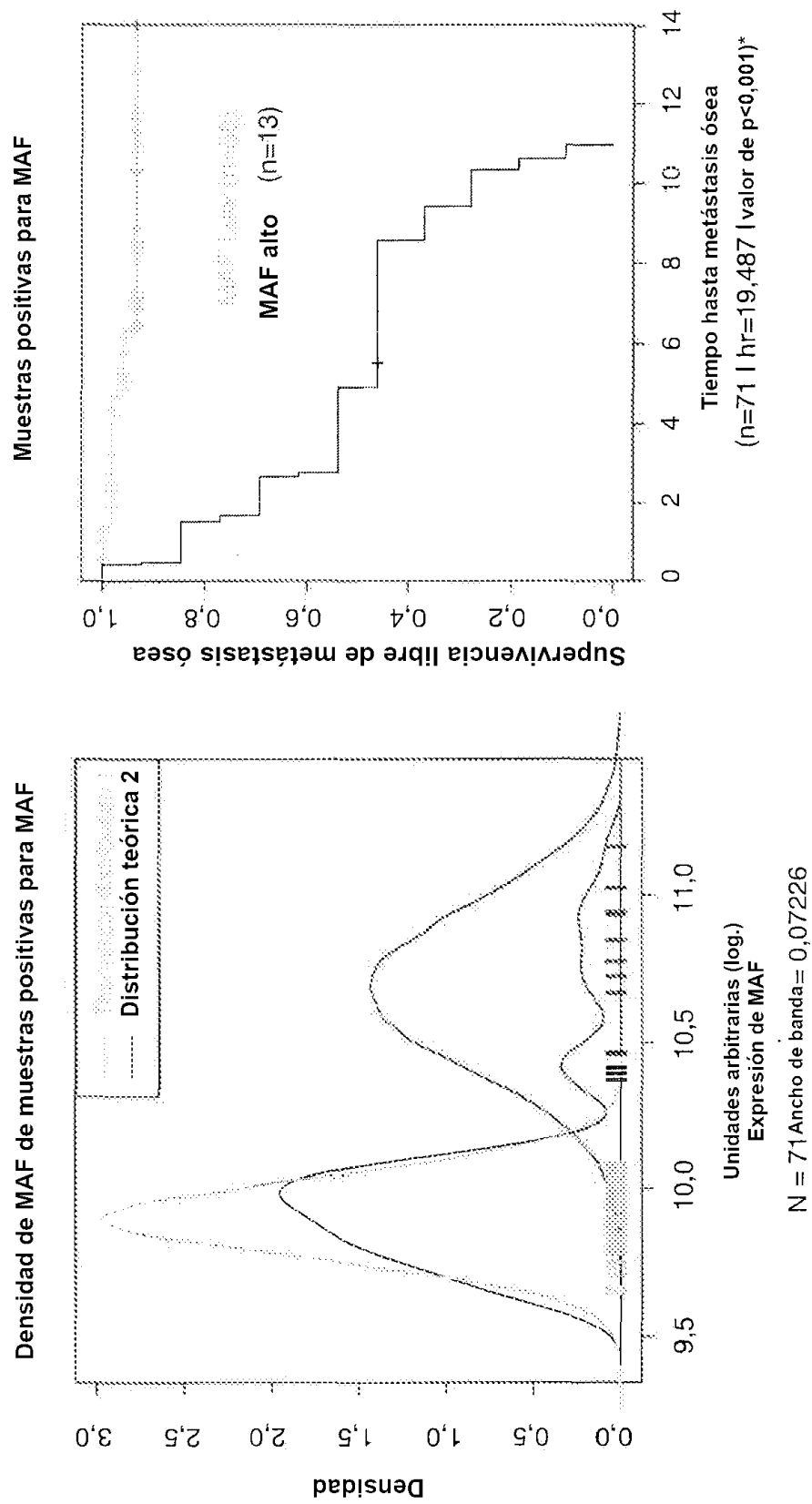
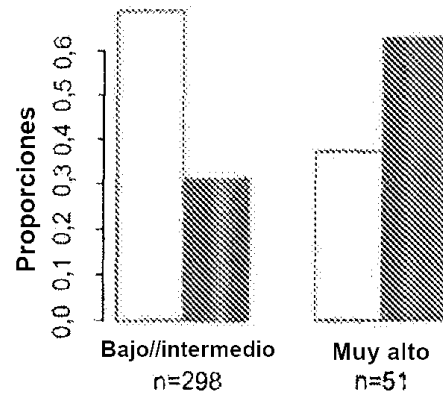


Figura 13

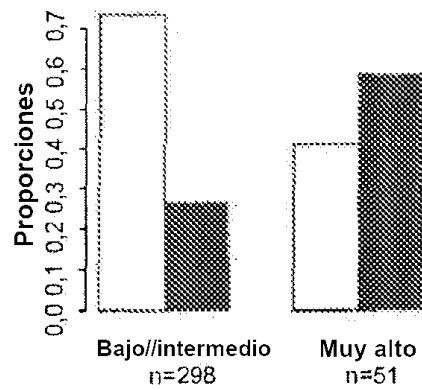
Proporción de recaída ósea temprana de tumores de cáncer de mama ER+

Valor p de la prueba de Fisher $\approx 2,773e-05$



Proporción de recaída ósea temprana de tumores de cáncer de mama ER+ <5 años

Valor p de la prueba de Fisher $= 1,241e$



Proporción de recaída ósea temprana de tumores de cáncer de mama ER+ <3 años

Valor p de la prueba de Fisher $\approx 0,001804$

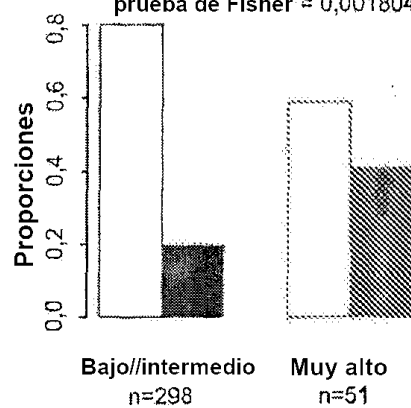


Figura 14

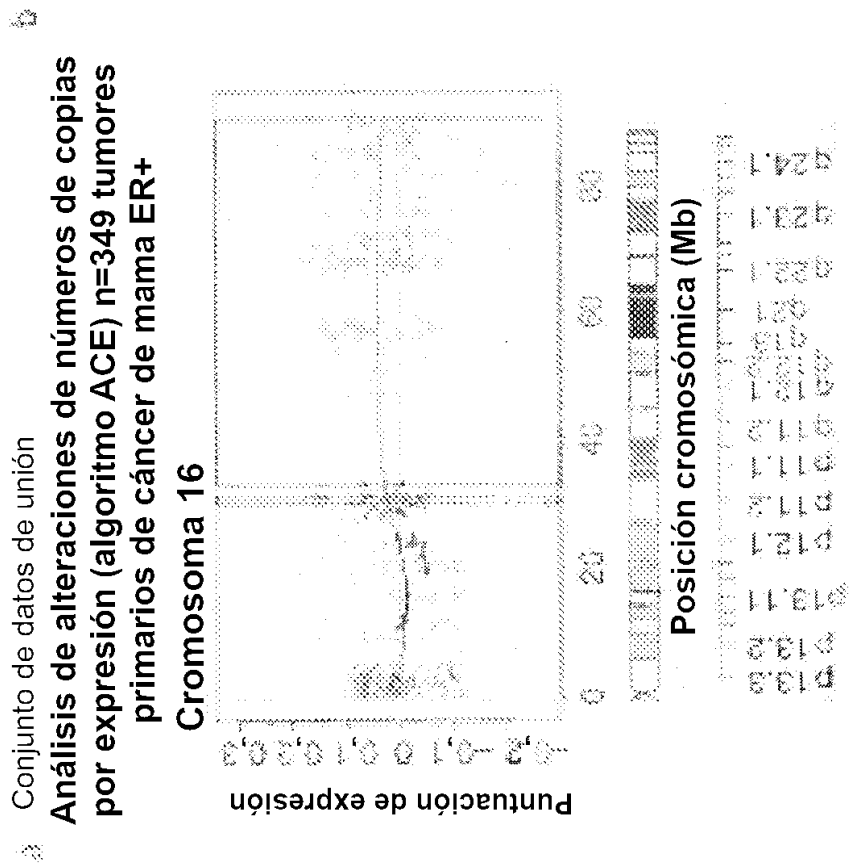


Figura 15

C

Análisis CGH de células
BoM2 frente a parentales

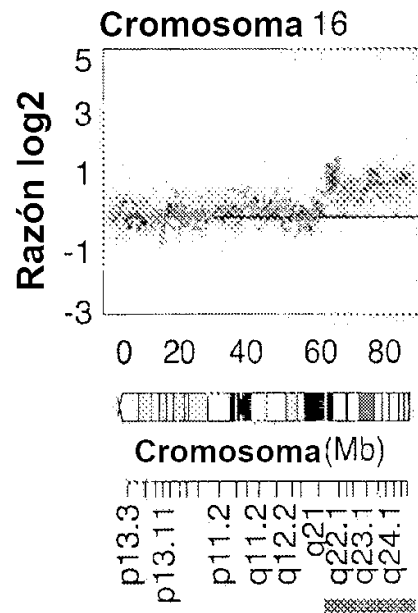


Figura 15

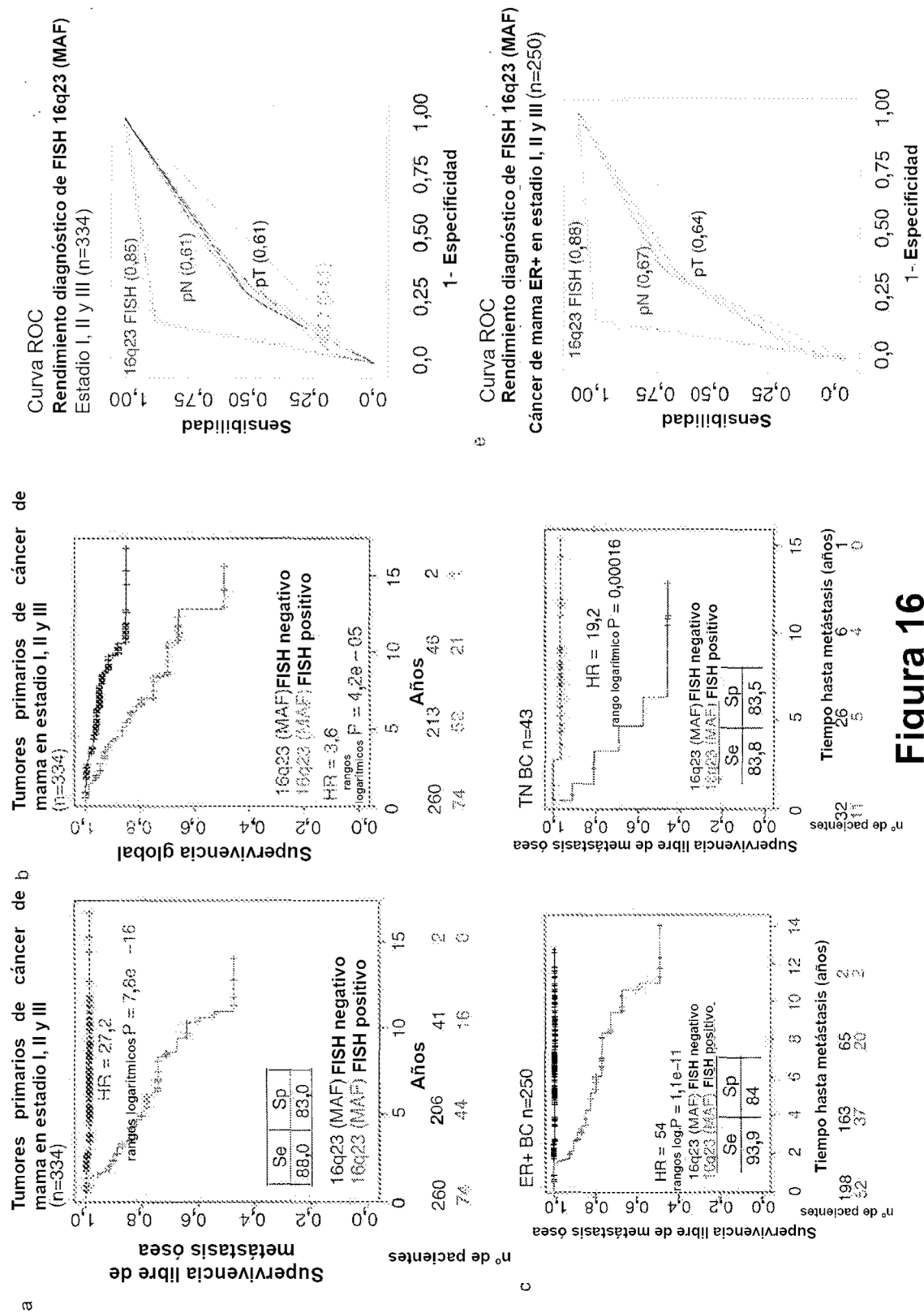


Figura 16