

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 586**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2013** **E 19174485 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.11.2021** **EP 3553186**

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

30 Prioridad:

12.10.2012 US 201261713318 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
19.04.2022

73 Titular/es:

INBIOMOTION, S.L. (100.0%)
Paris 175, 4-2
08036 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

GOMIS CABRÉ, ROGER y
JEAN-MAIRET, JOEL

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 906 586 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de metástasis de cáncer de próstata

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al diagnóstico o al pronóstico de metástasis en cáncer de próstata basándose en la determinación de si el gen c-MAF, dentro de la región genómica 16q22-24, está amplificado en una muestra de tumor primario. Asimismo, la invención también se refiere a un método para el diagnóstico o el pronóstico de metástasis en cáncer de próstata, así como a un método para diseñar una terapia personalizada en un sujeto con
- 10 cáncer de próstata, que comprende determinar la amplificación o el número de copias del gen c-MAF. Finalmente, la invención se refiere al uso de un agente que puede prevenir o inhibir la degradación ósea como diana terapéutica para el tratamiento de metástasis ósea.

Técnica anterior

El problema:

- 15 La metástasis, un proceso complejo provocado por complejas interacciones entre células tumorales y tejidos normales circundantes en diferentes órganos vitales, representa el 90 por ciento de todas las muertes por cáncer en pacientes con tumores sólidos. Los mecanismos moleculares y celulares que llevan a los tumores primarios a formar metástasis deben entenderse para poder abordar mejor este importante problema potencialmente mortal. La identificación de genes y mecanismos de metástasis es esencial para comprender la biología básica de este estado letal y sus implicaciones para la práctica clínica.

Introducción e interés: Metástasis específica del órgano de la próstata

- 20 El cáncer de próstata es una forma de cáncer que se desarrolla en la próstata, una glándula en el sistema reproductor masculino. La mayoría de los cánceres de próstata son de crecimiento lento; sin embargo, hay casos de cánceres de próstata agresivos. Las células cancerosas pueden metastatizar (diseminarse) desde la próstata hasta otras partes del cuerpo, particularmente los huesos y los ganglios linfáticos. El cáncer de próstata puede provocar dolor, dificultad para orinar, problemas durante las relaciones sexuales o disfunción eréctil. Otros síntomas pueden desarrollarse potencialmente durante estadios posteriores de la enfermedad.

- 25 Las tasas de detección de cánceres de próstata varían ampliamente en todo el mundo, y habiendo una detección menos frecuente en el sur y este de Asia que en Europa, y especialmente en los Estados Unidos. El cáncer de próstata tiende a desarrollarse en hombres mayores de cincuenta años y, aunque es uno de los tipos de cáncer más prevalentes en los hombres, muchos nunca presentan síntomas, no se someten a terapia y, finalmente, mueren por otras causas. Alrededor de dos tercios de los casos son de crecimiento lento, el otro tercio es más agresivo y de rápido desarrollo.

- 30 Muchos factores, incluyendo la genética y la dieta, se han implicado con el desarrollo de cáncer de próstata. La presencia de cáncer de próstata puede estar indicada por síntomas, examen físico, antígeno prostático específico (APE) o biopsia. La prueba de PSA aumenta la detección de cáncer pero no disminuye la mortalidad. Además, el cribado de la prueba de próstata es controvertido en este momento y puede llevar a consecuencias innecesarias e incluso perjudiciales en algunos pacientes. No obstante, la sospecha de cáncer de próstata suele confirmarse tomando una biopsia de la próstata y examinándola bajo un microscopio. Pueden realizarse pruebas adicionales, como tomografías computarizadas y gammagrafías óseas, para determinar si el cáncer de próstata se ha
- 40 diseminado.

- Las estrategias de manejo para el cáncer de próstata deben guiarse por la gravedad de la enfermedad. Muchos tumores de bajo riesgo pueden seguirse de manera segura con vigilancia activa. El tratamiento curativo generalmente implica cirugía, diversas formas de radioterapia o, menos frecuentemente, criocirugía; la terapia hormonal y la quimioterapia generalmente se reservan para los casos de enfermedad avanzada (aunque la terapia hormonal puede administrarse con radiación en algunos casos).
- 45

- La edad y la salud subyacente del hombre, la extensión de la metástasis, el aspecto bajo el microscopio y la respuesta del cáncer al tratamiento inicial son importantes para determinar el desenlace de la enfermedad. La decisión de tratar o no el cáncer de próstata localizado (un tumor que se encuentra dentro de la próstata) con una intención curativa es una compensación del paciente entre los efectos beneficiosos y perjudiciales esperados en
- 50 cuanto a supervivencia del paciente y calidad de vida.

Las causas específicas del cáncer de próstata siguen siendo desconocidas. Los antecedentes genéticos pueden contribuir al riesgo de cáncer de próstata, tal como lo sugieren asociaciones con la raza, la familia y las variantes genéticas específicas. Ningún gen único es responsable del cáncer de próstata; se han implicado muchos genes diferentes. Las mutaciones en BRCA1 y BRCA2, importantes factores de riesgo para el cáncer de ovario y el cáncer

de mama en mujeres, también se han implicado con el cáncer de próstata. Otros genes relacionados incluyen el gen 1 del cáncer de próstata hereditario (HPC1), el receptor de andrógenos y el receptor de vitamina D. La fusión de la familia de genes TMPRSS2-ETS, específicamente TMPRSS2-ERG o TMPRSS2-ETV1/4 promueve el crecimiento de las células cancerosas.

- 5 La pérdida de los genes supresores de cáncer, al inicio de la carcinogénesis de la próstata, se ha localizado en los cromosomas 8p, 10q, 13q y 16q. Las mutaciones de p53 en el cáncer de próstata primario son relativamente bajas y se ven con más frecuencia en entornos metastásicos, por lo tanto, las mutaciones de p53 son un acontecimiento tardío en la patología del cáncer de próstata. Otros genes supresores de tumores que se cree que desempeñan un papel en el cáncer de próstata incluyen PTEN (gen) y KAI1. Hasta el 70 por ciento de los hombres con cáncer de
- 10 próstata han perdido una copia del gen PTEN en el momento del diagnóstico. También se ha observado la frecuencia relativa de pérdida de E-cadherina y CD44.

- El cáncer de próstata se clasifica como un adenocarcinoma o cáncer glandular, que comienza cuando las células normales de la glándula prostática secretora de semen se transforman en células cancerosas. La región de la glándula prostática donde el adenocarcinoma es más común es la zona periférica. Inicialmente, pequeños grupos de
- 15 células cancerosas permanecen confinados a glándulas prostáticas de otro modo normales, un estado conocido como carcinoma *in situ* o neoplasia intraepitelial prostática (PIN). Aunque no hay pruebas de que PIN sea un precursor del cáncer, se relaciona estrechamente con el cáncer. Con el tiempo, estas células cancerosas comienzan a multiplicarse y se diseminan al tejido prostático circundante (el estroma) formando un tumor. Eventualmente, el tumor puede crecer lo suficiente como para invadir órganos cercanos, tales como las vesículas seminales o el recto,
- 20 o las células tumorales pueden desarrollar la capacidad de viajar en el torrente sanguíneo y el sistema linfático. El cáncer de próstata se considera un tumor maligno porque es una masa de células que puede invadir otras partes del cuerpo. Esta invasión de otros órganos se llama metástasis. El cáncer de próstata con mayor frecuencia se metastatiza a los huesos, los ganglios linfáticos y puede invadir el recto, la vejiga y los uréteres inferiores después de la progresión local.

25 Rasgos moleculares del cáncer de próstata

RUNX2 es un factor de la transcripción que evita que las células cancerosas experimenten apoptosis contribuyendo de ese modo al desarrollo de cáncer de próstata.

- La cascada de señalización PI3k/Akt actúa con la cascada de señalización del factor de crecimiento transformante beta/SMAD para garantizar la supervivencia de células de cáncer de próstata y la protección contra la apoptosis. Se
- 30 ha planteado la hipótesis de que el inhibidor de la apoptosis ligado a X (XIAP) promueve la supervivencia de células de cáncer de próstata y el crecimiento y es una diana de investigación dado que si este inhibidor puede suprimirse, entonces la cascada de la apoptosis puede proseguir su función en la prevención de proliferación de células cancerosas. La citocina-1 inhibidora de macrófagos (MIC-1) estimula la ruta de señalización de cinasa de adhesión focal (FAK) que conduce a crecimiento y supervivencia de células de cáncer de próstata.

- 35 El receptor de andrógenos ayuda a las células de cáncer de próstata a sobrevivir y es una diana para muchos estudios de investigación contra el cáncer; hasta ahora, la inhibición del receptor de andrógenos sólo ha demostrado ser eficaz en estudios con ratones. El antígeno prostático específico de membrana (PSMA) estimula el desarrollo del cáncer de próstata al aumentar los niveles de folato para que las células cancerosas lo utilicen para sobrevivir y crecer; PSMA aumenta los folatos disponibles para su uso al hidrolizar los folatos glutamados.

40 Diagnóstico

La única prueba que puede confirmar completamente el diagnóstico de cáncer de próstata es una biopsia, la extracción de pequeñas porciones de la próstata para un examen microscópico. Sin embargo, antes de una biopsia, pueden realizarse pruebas menos invasivas.

- También hay otras pruebas que pueden usarse para recopilar más información sobre la próstata y las vías urinarias.
- 45 El examen rectal digital (DRE) puede permitir que un médico detecte anomalías de la próstata. La cistoscopia muestra las vías urinarias desde el interior de la vejiga, usando un tubo con cámara delgado y flexible insertado en la uretra. La ecografía transrectal crea una imagen de la próstata usando ondas de sonido de una sonda en el recto.

- El documento WO 2008/104543 A2 describe un kit para la predicción *in vitro* de la aparición de metástasis en un paciente, comprendiendo el kit medios para detectar y/o cuantificar uno o más marcadores biológicos, incluyendo
- 50 MAF, que son indicativos de una aparición de metástasis en tejido óseo.

El documento ES 2379918 A1 da a conocer la cuantificación de la expresión de c-MAF para el diagnóstico o pronóstico de metástasis o para diseñar una terapia personalizada en un paciente con cáncer de mama ER+.

- El documento EP 2012128 A1 describe una asociación entre el nivel de fosforilación de treonina 254 de NF-kappa B-p65/RelA en células de cáncer de próstata y la probabilidad de que el cáncer de próstata conduzca a metástasis
- 55 ósea.

Obtención de imágenes de la próstata

Los ultrasonidos (US) y las imágenes de resonancia magnética (IRM) son los dos métodos de obtención de imágenes principales usados para la detección de cáncer de próstata.

Biopsia

- 5 Micrografía que muestra un cáncer de próstata (adenocarcinoma convencional) con invasión perineural. Tinción H&E.

Si se sospecha de cáncer, se ofrece una biopsia de manera conveniente. Durante una biopsia, un urólogo o radiólogo obtiene muestras de tejido de la próstata a través del recto. Una pistola de biopsia inserta y extrae agujas especiales de núcleo hueco (generalmente de tres a seis en cada lado de la próstata) en menos de un segundo. Las biopsias de próstata se realizan habitualmente en forma ambulatoria y rara vez requieren hospitalización. El cincuenta y cinco por ciento de los hombres comunican molestias durante la biopsia de próstata.

Puntuación de Gleason

15 Luego, las muestras de tejido se examinan bajo un microscopio para determinar si hay células cancerosas y para evaluar las características microscópicas (o puntuación de Gleason) de cualquier cáncer encontrado. El antígeno prostático específico de membrana es una carboxipeptidasa transmembrana y presenta actividad folato hidrolasa. Esta proteína se sobreexpresa en tejidos de cáncer de próstata y se asocia con una puntuación de Gleason más alta.

Marcadores tumorales

- 20 Pueden teñirse muestras de tejido para determinar la presencia de PSA y otros marcadores tumorales con el fin de determinar el origen de células malignas que se han metastatizado.

25 El carcinoma de células pequeñas es un tipo muy raro (1%) de cáncer de próstata que no puede diagnosticarse usando el PSA. A partir de 2009, los investigadores están tratando de determinar la mejor manera de cribar este tipo de cáncer de próstata porque es un tipo de cáncer de próstata relativamente desconocido y raro, pero muy grave y se propaga rápidamente a otras partes del cuerpo. Los posibles métodos incluyen métodos de separación cromatográfica por espectrometría de masas, o captura de proteínas por inmunoensayos o anticuerpos inmunizados. El método de prueba implicará la cuantificación de la cantidad del biomarcador PCI, con referencia a la puntuación de Gleason. Esta prueba no sólo es rápida, sino que también es sensible. Puede detectar pacientes en la zona gris de diagnóstico, particularmente aquellos con una razón de antígeno prostático específico con respecto a libre en suero total del 10-20%.

- 30 La expresión de Ki-67 por inmunohistoquímica puede ser un predictor significativo del desenlace del paciente para hombres con cáncer de próstata.

Clasificación

35 Una parte importante de la evaluación del cáncer de próstata es determinar el estadio o la extensión del cáncer. Conocer el estadio ayuda a definir el pronóstico y es útil para seleccionar terapias. El sistema más común es el sistema TNM de cuatro estadios (abreviado de Tumor/Nódulos/Metástasis). Sus componentes incluyen el tamaño del tumor, el número de ganglios linfáticos afectados y la presencia de cualquier otra metástasis.

40 La distinción más importante hecha por cualquier sistema de estadificación es si el cáncer todavía está confinado a la próstata. En el sistema TNM, los cánceres clínicos T1 y T2 se encuentran sólo en la próstata, mientras que los cánceres T3 y T4 se han diseminado en otros lugares. Pueden usarse varias pruebas para buscar evidencia de diseminación. Estas incluyen tomografía computarizada para evaluar la diseminación dentro de la pelvis, gammagrafías óseas para buscar diseminación a los huesos e imágenes de resonancia magnética de bobina endorrectal para evaluar de cerca la cápsula prostática y las vesículas seminales. Las gammagrafías óseas deben revelar un aspecto osteoblástico debido al aumento de la densidad ósea en las áreas de metástasis óseas, en oposición a lo que se encuentra en muchos otros cánceres que se metastatizan.

45 Después de una biopsia de próstata, un patólogo observa las muestras bajo un microscopio. Si hay cáncer, el patólogo notifica el grado del tumor. El grado indica cuánto difiere el tejido tumoral del tejido prostático normal y sugiere qué tan rápido es probable que crezca el tumor. El sistema de Gleason se usa para clasificar los tumores de próstata de 2 a 10, donde una puntuación de Gleason de 10 indica la mayoría de las anomalías. El patólogo asigna un número desde 1 hasta 5 para el patrón más común observado bajo el microscopio, luego hace lo mismo para el segundo patrón más común. La suma de estos dos números es la puntuación de Gleason. La estadificación de Whitmore-Jewett es otro método usado a veces.

Cribado

El cribado de cáncer de próstata es un intento de detectar cánceres insospechados y puede conducir a pruebas de

seguimiento más específicas, tales como una biopsia, con muestras de células tomadas para un estudio más detallado. Las opciones incluyen el examen rectal digital (DRE) y el análisis de sangre del antígeno prostático específico (PSA). Tal cribado es controvertido y, en algunos pacientes, puede conducir a consecuencias innecesarias e incluso perjudiciales. Un análisis de 2010 concluyó que el cribado de rutina con un DRE o PSA no está respaldado por la evidencia, ya que no hay un beneficio de mortalidad de la prueba. Más recientemente, la Preventive Services Task Force de los Estados Unidos (USPSTF, por sus siglas en inglés) no recomendó la prueba de PSA para el cribado de cáncer de próstata en hombres sanos. Esta recomendación de la USPSTF, emitida en octubre de 2011, se basa en estudios de "revisión de evidencias" que concluyen que "el cribado basado en el antígeno prostático específico da como resultado una reducción pequeña o nula de la mortalidad específica por cáncer de próstata y se asocia con daños relacionados con la evaluación y tratamientos posteriores, algunos de los cuales pueden ser innecesarios.

Las pruebas de cribado modernas han encontrado cánceres que podrían no haberse desarrollado en una enfermedad grave, y que "la ligera reducción del riesgo extirpando quirúrgicamente la próstata o tratándola con radiación puede no superar los efectos secundarios sustanciales de estos tratamientos", una opinión también compartida por el CDC.

Cáncer agresivo

Si el cáncer se ha diseminado más allá de la próstata, las opciones de tratamiento cambian significativamente, por lo que la mayoría de los médicos que tratan el cáncer de próstata usan una variedad de nomogramas para predecir la probabilidad de diseminación. El tratamiento mediante observación atenta/vigilancia activa, radioterapia de haz externo, braquiterapia, criocirugía, HIFU y cirugía se ofrecen, en general, a los hombres cuyo cáncer permanece dentro de la próstata. La terapia hormonal y la quimioterapia a menudo se reservan para enfermedades que se han diseminado más allá de la próstata. Sin embargo, hay excepciones: la radioterapia puede usarse para algunos tumores avanzados, y la terapia hormonal se usa para algunos tumores de estadio temprano. La crioterapia (el proceso de congelación del tumor), la terapia hormonal y la quimioterapia también pueden ofrecerse si el tratamiento inicial falla y el cáncer avanza.

Si la enfermedad ha alcanzado el estadio clínico T3 o T4, se clasifica como cáncer de próstata avanzado. El cáncer de próstata avanzado con metástasis ósea o metástasis en los ganglios linfáticos es más probable que provoque síntomas de cáncer de próstata que un estadio temprano de la enfermedad. Los médicos buscan habitualmente metástasis ósea y metástasis en los ganglios linfáticos que se denotan respectivamente por M y N en la estadificación clínica.

En el estadio clínico T3, el tumor se ha extendido más allá de la cápsula prostática, posiblemente hacia las vesículas seminales, y se denomina específicamente extensión extraprostática. Extraprostático significa "independiente de la glándula prostática". En el estadio clínico T4, la enfermedad invade los órganos circundantes (distintos de las vesículas seminales), tales como el cuello vesical, el esfínter externo o el recto.

Es más probable que la metástasis se produzca durante cáncer de próstata avanzado. Enfermedad metastásica se refiere un cáncer de próstata que ha dejado la glándula prostática y sus órganos vecinos. La metástasis ósea en cáncer de próstata y metástasis en los ganglios linfáticos avanzadas, que pueden ser locales o distantes, están asociadas con cáncer de próstata avanzado. Las metástasis pueden implicar síntomas que no están en la Guía de tratamiento del cáncer de próstata.

Metástasis en los ganglios linfáticos de cáncer de próstata. El cuerpo produce un líquido llamado linfa que contiene glóbulos blancos y circula a través del sistema linfático. Los ganglios linfáticos son órganos ovalados o circulares pequeños que filtran ese líquido. Las células cancerosas que circulan por el cuerpo pueden quedar atrapadas en los ganglios linfáticos. Una vez atrapadas, las células cancerosas pueden comenzar su ciclo de división no saludable y provocar metástasis en los ganglios linfáticos.

Existen dos tipos de metástasis en los ganglios linfáticos: local y distante. La metástasis en los ganglios linfáticos local está designada por el estadio clínico N1. Dos ganglios linfáticos se encuentran a ambos lados de la vejiga. Debido a que estos nódulos están cerca de la glándula prostática, la metástasis se considera local. Si las células cancerosas comienzan a crecer en cualquier otro ganglio linfático, la metástasis se considera distante. La metástasis en los ganglios linfáticos distante está designada por el estadio clínico M1a.

Metástasis ósea de cáncer de próstata. Los casos primarios de cáncer de huesos son relativamente raros. Los pacientes que desarrollan cáncer de huesos son más propensos a desarrollar la enfermedad como resultado de metástasis de cáncer de próstata avanzado. En el cáncer de próstata, la extensión que conduce a una enfermedad ósea se designa mediante un estadio clínico M1b. Si una persona desarrolla una enfermedad ósea como resultado del cáncer de próstata, ahora no tiene cáncer de huesos. Debido a que el cáncer se clasifica según su origen, tiene cáncer de próstata con metástasis ósea.

Las metástasis esqueléticas se producen en más del 80% del cáncer de próstata en estadio avanzado y confieren un alto nivel de morbilidad, una tasa de supervivencia a 5 años del 25% y una mediana de supervivencia de aproximadamente 40 meses. De las aproximadamente un millón de muertes anuales asociadas con enfermedad

ósea metastásica en los EE.UU., la UE y Japón, aproximadamente el 20% son casos de cáncer de próstata en estadio avanzado. El cáncer de próstata metastásico sin tratamiento es en gran medida sensible a la terapia de privación de andrógenos, pero la progresión un cáncer de próstata resistente a la castración se produce 18-20 meses después de comenzar el tratamiento. La enfermedad ósea metastásica provoca algunos de los síntomas más alarmantes de cáncer en estadio avanzado; las estimaciones indican que el tratamiento del dolor óseo se requiere en aproximadamente el 30% de los hombres con cáncer de próstata resistente a la castración y asociado con enfermedad ósea metastásica; requiriendo el 22% tratamiento para fracturas esqueléticas patológicas singulares o múltiples; el 7% para la compresión de la médula espinal; el 3-4% para hemiparesia o paresia. En el primer diagnóstico de metástasis ósea, la intervención terapéutica implica habitualmente quimioterapia sistémica, terapia hormonal y bisfosfonatos o denosumab, que son en su mayoría opciones paliativas con la intención de reducir el dolor.

En el hueso esquelético sano, se logra un equilibrio equitativo entre la formación de la nueva matriz ósea y la reabsorción de la matriz ósea anterior mediante la actividad coordinada de los osteoclastos que degradan los huesos y los osteoblastos formadores de huesos. Durante la enfermedad ósea con metástasis, el equilibrio normal entre la reabsorción y formación ósea se ve interrumpido por las interacciones homotípicas y heterotípicas entre células que se producen entre células tumorales invasoras, osteoblastos y osteoclastos. La mayoría de los pacientes con tumores óseos secundarios, incluidos los asociados con cáncer de próstata resistente a la castración, presentan lesiones osteolíticas. Por tanto, la mayoría de las estrategias de tratamiento en uso actual o en evaluación en la enfermedad ósea metastásica se han diseñado para proteger la matriz ósea del aumento de la actividad degradante ósea de los osteoclastos. Una complicación adicional que se presenta en más del 80% de los hombres con cáncer de próstata resistente a la castración y enfermedad ósea con metástasis, son las lesiones osteoscleróticas, también conocidas como lesiones osteoblásticas o formadoras de hueso, o una combinación de ambas, las lesiones osteolíticas y osteoscleróticas, también denominadas lesiones mixtas. Las lesiones osteoscleróticas se tipifican por depósitos óseos con múltiples capas de fibrillas de colágeno tipo I mal organizadas que tienen un aspecto tejido y una resistencia mecánica reducida.

Las células de cáncer de próstata conservan, entre cada subtipo, los cambios transcripcionales inducidos por la aberración del genoma con alta fidelidad. Los genes dominantes resultantes revelan acontecimientos moleculares que predicen el desenlace metastásico a pesar de la existencia de una heterogeneidad genómica, transcripcional, traduccional y biológica sustancial en todo el sistema. Sin embargo, se desconoce si el historial de desarrollo de un cáncer daría como resultado mediadores diferentes o comunes de metástasis específica del sitio. Los factores predisponentes relacionados con la célula de origen pueden generar diferentes barreras limitadoras de la velocidad durante la progresión metastásica. En el presente documento, se propone el uso de un nuevo biomarcador como factor pronóstico en tumores primarios que predice acontecimientos futuros de metástasis óseas. Además, también se propone el uso de este gen como posible diana terapéutica para prevenir, detener y curar la metástasis ósea derivada de cáncer de próstata.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han determinado que la identificación del equilibrio de señales que afectan a la metástasis ósea de las células de cáncer de próstata diseminadas proporciona información valiosa para establecer el pronóstico y para la intervención terapéutica preventiva contra la enfermedad. Basándose en el nivel de expresión de c-MAF y la amplificación genómica de metástasis ósea de cáncer de mama ER+ 16q22-24 *bona fide*, incluyendo el gen MAF, la contribución a la metástasis ósea y particularmente la metástasis ósea osteolítica, los presentes inventores identificaron que 16q22-24, incluido el gen MAF, es también es responsable de conducir las lesiones metastásicas óseas de la próstata, en particular la metástasis ósea de la próstata osteolítica.

Los presentes inventores han identificado c-MAF como marcador asociado con una mayor tendencia del cáncer de próstata a provocar metástasis y, en particular, metástasis ósea. Esta sobreexpresión parece deberse a una amplificación del locus 16q22-q24 en el que se encuentra el gen c-MAF.

Los niveles de expresión de c-MAF se estudiaron en una micromatriz de tejido compuesta por biopsias de tumores primarios de próstata que incluyen 5 tumores que desarrollan metástasis al hueso en cualquier momento, 3 que desarrollan metástasis a otros sitios, excepto hueso y un seguimiento clínico mínimo de 5 años y 29 tumores primarios de próstata que nunca desarrollan metástasis con un seguimiento clínico mínimo de 5 años, la expresión de la proteína c-MAF en células tumorales y la biopsia se correlacionan positivamente con diferentes parámetros clínicos, incluyendo metástasis y metástasis ósea. Además, los inventores han asociado la amplificación del locus genómico 16q22-q24, incluyendo el gen c-MAF, con la presencia de metástasis en sujetos con cáncer de próstata y, en particular, en el cáncer de próstata que forma metástasis ósea.

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

(i) cuantificar la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en una muestra de tumor de próstata de dicho sujeto y

(ii) comparar la amplificación o el número de copias obtenido en (i) con la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en una muestra de control,

en el que si la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en dicha muestra tumoral está aumentado con respecto a la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en la muestra de control, entonces dicho sujeto

5 tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis.

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

(i) cuantificar la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en una muestra de tumor de próstata de dicho sujeto, y

10 (ii) comparar la amplificación o el número de copias obtenido en (i) con la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en una muestra de control,

en el que si la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en la muestra tumoral está aumentado con respecto a la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en la muestra de control, entonces dicho sujeto es susceptible a recibir una terapia destinada a prevenir, inhibir y/o tratar metástasis del cáncer o una terapia para

15 prevenir o inhibir la degradación ósea.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un agente que puede prevenir o inhibir la degradación ósea para su uso en el tratamiento de metástasis ósea en un sujeto que se ha identificado que tiene una amplificación del gen c-MAF o un número de copias aumentado en comparación con un valor de referencia, en el que el agente que puede

20 prevenir o inhibir la degradación ósea se selecciona del grupo que consiste en: un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, un inhibidor de PTH o PTHLH (incluyendo anticuerpos neutralizantes y péptidos), un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor dual de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógenos, un inhibidor de EGFR, calcitonina, radio-223 y un inhibidor de cathepsina K.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método de clasificación de un sujeto que padece cáncer de próstata en una cohorte, que comprende: a) determinar la amplificación o el número de copias de c-MAF en una

25 muestra de tumor de próstata de dicho sujeto; b) comparar la amplificación o el número de copias de c-MAF en dicha muestra con una amplificación o un número de copias de c-MAF de referencia predeterminado; y c) clasificar dicho sujeto en una cohorte basándose en dicha amplificación o dicho número de copias de c-MAF en la muestra.

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

30 (i) cuantificar la amplificación o el número de copias de c-MAF en dicha muestra;

(ii) tipificar dicha muestra comparando la amplificación o el número de copias de c-MAF con una amplificación o un número de copias de c-MAF de referencia predeterminado;

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

35 En un quinto aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto que tiene cáncer de próstata con metástasis ósea que comprende determinar si el gen c-MAF está amplificado en una muestra tumoral de dicho sujeto en relación con un número de copias del gen de referencia, en el que una amplificación del gen c-MAF con respecto a dicho número de copias del gen de referencia indica que el sujeto es un candidato para recibir clodronato.

40 Descripción detallada de la invención

Métodos para el diagnóstico y pronóstico de metástasis de cáncer de próstata basándose en la expresión de niveles de c-MAF

Los inventores han demostrado que el gen y la proteína c-MAF están sobreexpresados en la metástasis de cáncer de próstata, y que los niveles de expresión de c-MAF en los tumores primarios de próstata se correlacionan con

45 diferentes parámetros clínicos del cáncer de próstata, particularmente con la probabilidad de recaída y metástasis. Por tanto, la sobreexpresión de c-MAF está asociada con la aparición y el alto riesgo de metástasis en tumores de próstata, particularmente en el hueso. Por tanto, c-MAF puede usarse como marcador para el diagnóstico y/o pronóstico de metástasis, en particular metástasis ósea, en un sujeto con cáncer de próstata.

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

50 próstata que comprende

(i) cuantificar el nivel de expresión del gen c-MAF en una muestra de tumor (por ejemplo, tejido de tumor de próstata,

célula de tumor de próstata circulante, ADN de tumor de próstata circulante) de dicho sujeto y

(ii) comparar el nivel de expresión obtenido previamente con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra de control,

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

El gen c-MAF (homólogo de oncogén de fibrosarcoma musculoponeurótico v-maf (aviar) también conocido como MAF o MGC71685) es un factor de la transcripción que contiene una cremallera de leucina que actúa como un homodímero o un heterodímero. Según el sitio de unión a ADN, la proteína codificada puede ser un activador o represor transcripcional. La secuencia de ADN que codifica para c-MAF se describe en la base de datos NCBI con el número de registro NG_016440 (SEQ ID NO: 1) (codificante)). La secuencia genómica de c-MAF se establece en SEQ ID NO: 13. Los métodos de la presente divulgación pueden utilizar o bien la secuencia codificante o bien la secuencia de ADN genómico. Se transcriben dos ARN mensajeros a partir de dicha secuencia de ADN, cada uno de los cuales dará lugar a una de las dos isoformas de la proteína c-MAF, la isoforma α y la isoforma β . Las secuencias de ADN complementarias para cada una de las isoformas se describen, respectivamente, en la base de datos NCBI con los números de registro NM_005360.4 (SEQ ID NO: 2) y NM_001031804.2 (SEQ ID NO: 3). El uso del gen c-MAF para predecir el pronóstico de cáncer de mama ER+ y triple negativo se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO2013153458. El uso del gen c-MAF para predecir el pronóstico de cáncer de pulmón se encuentra en la publicación de solicitud internacional n.º WO/2013/182912.

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

En la presente divulgación, "diagnóstico de metástasis en un sujeto con cáncer de próstata" se entiende como la identificación de una enfermedad (metástasis) por medio del estudio de sus signos, es decir, en el contexto de la presente divulgación por medio de niveles de expresión del gen c-MAF aumentados (es decir, sobreexpresión) en el tejido tumoral de cáncer de próstata con respecto a una muestra de control.

En la presente divulgación "pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cáncer de próstata" se entiende como el conocimiento basado en los signos si el cáncer de próstata que tiene dicho sujeto se metastatizará en el futuro. En el contexto de la presente divulgación, el signo es la sobreexpresión del gen c-MAF en tejido de tumor de próstata.

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

En un aspecto preferido, el primer método de la divulgación comprende cuantificar sólo el nivel de expresión del gen c-MAF como marcador individual, es decir, el método no implica determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional.

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 una mujer u hombre humano de cualquier edad o raza.

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

método de la presente divulgación.

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

Tal como entiende el experto en la técnica, los niveles de expresión génica pueden cuantificarse midiendo los niveles de ARN mensajero de dicho gen o de la proteína codificada por dicho gen.

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

Por tanto, el nivel de expresión del gen c-MAF puede cuantificarse a partir del ARN que resulta de la transcripción de dicho gen (ARN mensajero o ARNm) o, alternativamente, a partir del ADN complementario (ADNc) de dicho gen. Por tanto, en un aspecto particular de la divulgación, la cuantificación de los niveles de expresión del gen c-MAF comprende la cuantificación del ARN mensajero del gen c-MAF o un fragmento de dicho ARNm, ADN complementario del gen c-MAF o un fragmento de dicho ADNc o la mezcla de los mismos.

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

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

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

En el contexto de la presente divulgación, "variante funcionalmente equivalente de la proteína c-MAF" se entiende como (i) variantes de la proteína c-MAF (SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5) en la que uno o más de los residuos de aminoácido están sustituidos por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un residuo de aminoácido conservado), en el que tal residuo de aminoácido sustituido puede o no estar codificado por el código genético, o (ii) variantes que comprenden una inserción o una delección de uno o más aminoácidos y que tiene la misma función que la proteína c-MAF, es decir, para actuar como factor de la transcripción de unión a ADN. Pueden identificarse variantes de la proteína c-MAF usando métodos basados en la capacidad de c-MAF para promover la

proliferación celular *in vitro* tal como se muestra en la solicitud de patente internacional WO2005/046731, basados en la capacidad del supuesto inhibidor para bloquear la capacidad de transcripción de un gen indicador bajo el control del promotor ciclina D2 o de un promotor que contiene la región sensible a c-MAF (elemento sensible a MARE o c-MAF) en células que expresan c-MAF tal como se describe en el documento WO2008098351, o basados en la capacidad del supuesto inhibidor para bloquear la expresión del gen indicador bajo el control del promotor de IL-4 en respuesta a la estimulación con PMA/ionomicina en células que expresan NFATc2 y c-MAF tal como se describe en el documento US2009048117A.

Las variantes según la divulgación tienen preferiblemente 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 de proteína c-MAF específicas definidas previamente, se determina usando algoritmos y procesos computarizados que los conocen ampliamente los expertos en la técnica. La similitud entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP [Manual BLAST, 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 permite la detección y cuantificación de dicha proteína en una muestra de un sujeto. A modo de ilustración no limitativa, pueden cuantificarse dichos niveles de proteína, por ejemplo, usando anticuerpos con capacidad de unión a c-MAF (o un fragmento del mismo que contiene un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos usados en estos ensayos pueden o no marcarse. Los ejemplos ilustrativos de marcadores que pueden usarse incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos de quimioluminiscencia, sustratos de enzimas o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Hay una amplia variedad de ensayos conocidos que pueden usarse en la presente divulgación que usan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); estas técnicas incluyen inmunotransferencia de tipo Western o transferencia de tipo Western, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), EIA de competición (inmunoensayo enzimático de competición), DAS-ELISA (ELISA tipo sándwich doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de microalineamientos de proteína o biochips incluyendo anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas. Otros modos para detectar y cuantificar dicha proteína c-MAF incluyen técnicas de cromatografía por afinidad, ensayos de unión a ligando, etc. Cuando se usa un método inmunológico, cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe que se une a la proteína c-MAF con una alta afinidad puede usarse para detectar la cantidad del mismo. Esto incluiría, pero no se limita a, el uso de un anticuerpo, por ejemplo, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos humanizados, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos, nanocuerpos, alfacuerpos, péptidos grapados, y ciclopéptidos. Hay anticuerpos de proteínas anti-c-MAF comerciales en el mercado que pueden utilizarse en el contexto de la presente divulgación, tal como por ejemplo 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 de ratón anti-humano MAF, no conjugado, clón 6b8) de AbD Serotec, etc. Hay muchas compañías comerciales que ofrecen anticuerpos anti-c-MAF, tales como Abnova Corporation, Bethyl Laboratories, Bioworld Technology, GeneTex, etc.

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

El primer método de la divulgación comprende, en una segunda etapa, comparar el nivel de expresión del gen c-MAF obtenido en la muestra tumoral (incluyendo, pero sin limitarse a, una biopsia de tumor primario, células tumorales circulantes y ADN tumoral circulante) del sujeto con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra de control.

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

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

Dicha muestra de referencia se obtiene normalmente combinando cantidades iguales de muestras de una población de sujetos. Generalmente, las muestras de referencia típicas se obtendrán de sujetos que están clínicamente bien documentados y en los que la ausencia de metástasis está bien caracterizada. En tales muestras, las concentraciones normales (concentración de referencia) del biomarcador (gen c-MAF) pueden determinarse, por ejemplo, proporcionando la concentración media a lo largo de la población de referencia. Se tienen en cuenta varias consideraciones al determinar la concentración de referencia del marcador. Entre tales consideraciones están la edad, el peso, el sexo, el estado físico general del paciente y similares. Por ejemplo, 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 1000 sujetos, preferiblemente clasificados según las consideraciones anteriores, por ejemplo según varias categorías de edad. La colección de muestras de la que se deriva el nivel de referencia estará formada preferiblemente por sujetos que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente objeto del estudio (por ejemplo, cáncer de próstata). De manera similar, el valor de referencia dentro de una cohorte de pacientes puede establecerse utilizando una curva de rendimiento diagnóstico (ROC) y midiendo el área bajo la curva para todos los pares de sensibilidad y especificidad para determinar qué par proporciona los mejores valores y cuál es el valor de referencia correspondiente. ROC es un concepto estadístico convencional. Puede encontrarse una descripción en Stuart G. Baker "The Central Role of Receiver Operating Characteristic (ROC) curves in Evaluating Tests for the Early Detection of Cancer" Journal of The National Cancer Institute (2003) vol. 95, n.º 7, 511-515.

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

En la presente divulgación, "niveles de expresión aumentados" o "nivel de expresión aumentado" se entiende como el nivel de expresión, cuando se refiere a los niveles del gen c-MAF, mayor que aquellos en una muestra de referencia o muestra de control. Particularmente, puede considerarse que una muestra tiene altos niveles de expresión de c-MAF cuando los niveles de expresión en la muestra de referencia son 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 muestra aislada del paciente.

En el contexto de la presente divulgación, se entiende que "un sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis" cuando el cáncer de próstata que padece dicho sujeto ha metastatizado a otros órganos del cuerpo, en un aspecto particular, al hueso.

En aún otro aspecto, la metástasis al hueso es una 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 la resorción ósea (pérdida progresiva de la densidad ósea) se produce en la proximidad de la metástasis que resulta de la estimulación de la actividad de osteoclastos por las células tumorales y se caracteriza por dolor intenso, fracturas patológicas, hipercalcemia, compresión de la médula espinal y otros síndromes que resultan de la compresión nerviosa.

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

El experto en la técnica entenderá que no se pretende que la predicción de la tendencia a la metástasis de un tumor de próstata primario sea correcta para todos los sujetos que van a identificarse (es decir, para el 100% de los sujetos). Sin embargo, el término requiere permitir la identificación de una parte estadísticamente significativa de los sujetos (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohortes). El experto en la técnica puede determinar si una parte es estadísticamente significativa de una manera simple utilizando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, la determinación de valores p, la prueba de la T

de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Se proporcionan detalles en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley and Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. Los valores p son preferiblemente de 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 ó 0,0001. Más preferiblemente, al menos

5 aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80% o al menos aproximadamente el 90% de los sujetos de una población pueden identificarse de manera adecuada por el método de la presente divulgación.

Tal como se usa en el presente documento, "agente para evitar o prevenir la degradación ósea" se refiere a cualquier molécula que puede prevenir, inhibir, tratar, reducir o detener la degradación ósea o bien estimulando la

10 proliferación de osteoblastos o bien inhibiendo la proliferación de osteoclastos o fijando la estructura ósea.

Tal como se usa en el presente documento, un "agente inhibidor de c-MAF" se refiere a cualquier molécula que puede inhibir completa o parcialmente la expresión del gen c-MAF, tanto impidiendo que se produzca el producto de expresión de dicho gen (interrumpiendo la transcripción del gen c-MAF y/o bloqueando la traducción del ARNm procedente de la expresión del gen c-MAF) como inhibiendo directamente la actividad de la proteína c-MAF. Pueden

15 identificarse inhibidores de la expresión del gen c-MAF utilizando métodos basados en la capacidad del supuesto inhibidor para bloquear la capacidad de transcripción de un gen indicador bajo el control del promotor de ciclina D2 o de un promotor que contiene la región de respuesta a c-MAF (elemento sensible a MARE o c-MAF) en células que expresan c-MAF, tal

20 como se describe en el documento WO2008098351, o basados en la capacidad del supuesto inhibidor para bloquear la expresión de un gen indicador bajo el control del promotor de IL-4 en respuesta a la estimulación con PMA/ionomicina en células que expresan NFATc2 y c-MAF tal como se describe en el documento US2009048117A.

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

25

Tal como se usa en el presente documento, un "inhibidor de mTor" se refiere a cualquier molécula que puede inhibir completa o parcialmente la expresión del gen mTor, tanto impidiendo que se produzca el producto de expresión de dicho gen (interrumpiendo la transcripción del gen mTor y/o bloqueando la traducción del ARNm procedente de la expresión del gen mTor) como inhibiendo directamente la actividad de la proteína mTor. Incluidos los inhibidores que

30 tienen una diana dual o más, y entre ellas la actividad de la proteína mTor.

Tal como se usa en el presente documento, "Src" se refiere a aquellas proteínas que corresponden a EC 2.7.10.2. Src 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 que puede inhibir completa o parcialmente la expresión del gen Src, tanto impidiendo que se produzca el producto de expresión de dicho gen (interrumpiendo la transcripción del gen Src y/o bloqueando la traducción del ARNm procedente de la expresión del gen Src) como inhibiendo directamente la actividad de la proteína Src.

35

Tal como se usa en el presente documento, "prostaglandina-endoperoxidasa 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 el ácido araquidónico en endoperoxido de prostaglandina H2.

40

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

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

45

"Predecir", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la determinación de la probabilidad de que el sujeto que padece cáncer de pulmón desarrolle metástasis en un órgano distante. Tal como se usa en el presente documento, "buen pronóstico" indica que se espera (por ejemplo se predice) que el sujeto sobreviva y/o que no tenga, o tenga bajo riesgo de tener, recidiva o metástasis distantes dentro de un periodo de tiempo establecido. El término "bajo" es un término relativo y, en el contexto de esta solicitud, se refiere al riesgo del grupo de expresión "bajo" con respecto a un desenlace clínico (recidiva, metástasis distantes, etc.). Un riesgo "bajo" puede considerarse como un riesgo menor que el riesgo promedio para una población heterogénea de pacientes con cáncer. En el

55

estudio de Paik *et al.* (2004), se consideró que un riesgo de recidiva “bajo” global era inferior al 15 por ciento. El riesgo también variará en función del periodo de tiempo. El periodo de tiempo puede ser, por ejemplo, de cinco años, diez años, quince años o incluso veinte años después de realizarse el diagnóstico inicial de cáncer o después del pronóstico.

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

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

El término “tratamiento”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de terapia, que tiene el objetivo de terminar, prevenir, mejorar o reducir la propensión a un estado clínico tal como se describe en el presente documento. En un aspecto preferido, el término tratamiento se refiere a un tratamiento profiláctico (es decir, una terapia para reducir la propensión a un estado clínico) de un trastorno o de un estado tal como se define en el presente documento. Por tanto, “tratamiento”, “tratar” y sus términos equivalentes se refieren a obtener un efecto farmacológico o fisiológico deseado, que 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 completa 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 un efecto adverso atribuible al trastorno. Es decir, “tratamiento” incluye (1) prevenir que el trastorno se produzca o presente recidiva en un sujeto, (2) inhibir el trastorno, tal como detener su desarrollo, (3) detener o terminar el trastorno o al menos síntomas asociados con el mismo, de forma que el huésped ya no padezca el trastorno o sus síntomas, tal como provocar la regresión del trastorno o sus síntomas, por ejemplo, al restaurar o reparar una función perdida, que falta o defectuosa, o al estimular un proceso ineficiente, o (4) mitigar, aliviar o mejorar el trastorno o síntomas asociados con el mismo, en el que mejora se utiliza en un sentido amplio para referirse a al menos una reducción de la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor o deficiencia inmunitaria.

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

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 un producto génico producido por el gen en una muestra del sujeto, en el que el producto génico puede ser un producto transcripcional o un producto traduccional. Por consiguiente, el nivel de expresión puede referirse 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 una muestra del sujeto y/o una muestra o muestras de referencia, y por ejemplo, puede detectarse *de novo* o corresponder a una determinación previa. El nivel de expresión puede determinarse o medirse, por ejemplo, utilizando métodos de micromatrices, métodos de PCR (tales como qPCR) y/o métodos basados en anticuerpos, como se conoce por un experto en la técnica.

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

“Nivel de expresión aumentado” se entiende como el nivel de expresión cuando se refiere a los niveles del gen c-MAF mayores que aquellos en una muestra de referencia o muestra de control. Estos niveles aumentados pueden estar provocados, sin excluir otros mecanismos, por una translocación o amplificación del locus cromosómico 16q23 o 16q22-24 o gen. Particularmente, puede considerarse que una muestra tiene un alto nivel de expresión de c-MAF cuando el nivel de expresión en la muestra aislada del paciente es de al menos aproximadamente 1,1 veces,

1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a la referencia o control.

“Sonda”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de oligonucleótidos que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico de interés específica. En algunos aspectos, las sondas pueden ser específicas para regiones de cromosomas que se sabe que experimentan translocaciones. En algunos aspectos, las sondas tienen un marcador o etiqueta específica. En algunos aspectos, la etiqueta es un fluoróforo. En algunos aspectos, la sonda es una sonda de hibridación *in situ* de ADN cuyo marcaje se basa en la unión coordinativa estable de platino a ácidos nucleicos y proteínas. En algunos aspectos, la sonda se describe en la solicitud de patente estadounidense n.º US20090220955A1 y la solicitud de patente estadounidense n.º US2009002938A1, 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 está directa o indirectamente asociada con una sonda, permitiendo que la sonda o la ubicación de la sonda se visualice, marque o capte de otra manera.

“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 se produce en el mismo cromosoma. En algunos casos, la translocación se produce entre cromosomas diferentes. Las translocaciones se producen con una alta frecuencia en muchos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama y leucemia. Las translocaciones pueden ser o bien translocaciones recíprocas primarias o bien las translocaciones secundarias más complejas. Hay diversas translocaciones primarias que implican el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgH), que se cree que constituyen el acontecimiento iniciador en muchos cánceres. (Eychène, A., Rocques, N., y Puopponot, 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 algunos aspectos, la poliploidía se asocia con una acumulación de expresión del gen de interés. En algunos aspectos, la poliploidía se asocia con la inestabilidad genómica. En algunos aspectos, la inestabilidad genómica puede conducir a translocaciones de cromosomas.

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

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

“Muestra de tejido tumoral” se entiende como la muestra de tejido que se origina del tumor de cáncer de próstata, incluyendo, pero sin limitarse a, células tumorales circulantes y ADN tumoral circulante. Dicha muestra puede obtenerse mediante métodos convencionales, por ejemplo, biopsia, utilizando métodos bien conocidos por los expertos en técnicas médicas relacionadas.

“Metástasis ósea osteolítica” se refiere a un tipo de metástasis en la que se produce resorción ósea (pérdida progresiva de la densidad ósea) en la proximidad de la metástasis que resulta de la estimulación de la actividad de osteoclastos por las células tumorales y está caracterizado por dolor intenso, fracturas patológicas, hipercalcemia, compresión de la médula espinal y otros síndromes que resultan de la compresión nerviosa.

Método para diseñar terapia personalizada de la invención en pacientes con tumores de próstata.

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

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

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

(i) cuantificar la amplificación o el número de copias de c-MAF en una muestra de tumor de próstata de dicho sujeto y

(ii) comparar la amplificación o el número de copias previamente obtenido con la amplificación o el número de copias de dicho gen en una muestra de control,

5 en el que si la amplificación o el número de copias está aumentado con respecto a la amplificación o el número de copias de dicho gen en la muestra de control, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia dirigida a prevenir y/o tratar la metástasis o una terapia para prevenir o inhibir la degradación ósea. En un aspecto particular de este método, al sujeto se le administra luego al menos un fármaco terapéutico que previene, inhibe y/o trata la metástasis ósea.

10 En el que si el nivel de expresión del gen c-MAF no está aumentado con respecto a dicho valor de referencia, entonces dicho sujeto no es susceptible de recibir una terapia para prevenir la degradación ósea. En un aspecto particular de este método, al sujeto no se le administra luego al menos un fármaco terapéutico que previene, inhibe y/o trata la metástasis ósea.

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

Los términos y expresiones “sujeto”, “cáncer de próstata”, “muestra tumoral”, “metástasis”, “determinación de niveles de expresión”, “gen c-MAF”, “niveles de expresión aumentados” y “muestra de control” se han descrito en detalle en relación con el primer método de la divulgación y son igualmente aplicables al segundo y tercer método de la invención.

20 El segundo método de la invención comprende en una primera etapa cuantificar la amplificación o el número de copias de c-MAF en una muestra tumoral en un sujeto que padece cáncer de próstata.

En una realización preferida, el segundo método de la invención comprende cuantificar sólo la amplificación o el número de copias del gen c-MAF como un único marcador, es decir, el método no implica determinar el nivel de expresión de ningún marcador adicional.

25 En el caso del segundo método de la invención, la muestra es una muestra de tejido tumoral primario del sujeto. En una segunda etapa, el nivel de expresión del gen c-MAF obtenido en la muestra tumoral del sujeto se compara con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra de control. La determinación de los niveles de expresión del gen c-MAF debe relacionarse con valores de una muestra de control o muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor que va a analizarse, la naturaleza exacta de la muestra de control puede variar. Por tanto, preferiblemente la muestra de referencia es una muestra de tejido tumoral de un sujeto con cáncer de próstata que no ha metastatizado o que corresponde a la mediana del valor de los niveles de expresión del gen c-MAF medidos en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de próstata que no han metastatizado.

30 En aún otra realización, una amplificación o un número de copias de c-MAF que está por encima del promedio indica un riesgo aumentado de metástasis ósea, siendo el riesgo proporcional a los niveles de expresión de c-MAF. Por tanto, el riesgo de metástasis ósea en un sujeto que padece cáncer de pulmón es dependiente de la dosis.

35 Una vez que se ha medido la amplificación o el número de copias de c-MAF en la muestra y se ha comparado con la muestra de control, si la amplificación o el número de copias de dicho gen está aumentado con respecto a su amplificación o número de copias en la muestra de control, entonces se puede concluir que dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia dirigida a prevenir (si el sujeto todavía no ha experimentado metástasis) y/o tratar la metástasis (si el sujeto ya ha experimentado metástasis). Si no se observa tal amplificación o número de copias aumentado, entonces al sujeto no se le administra al menos un fármaco terapéutico que previene, inhibe y/o trata la metástasis ósea.

40 Tal como se usa en el presente documento, un “agente para evitar o prevenir la degradación ósea” se refiere a cualquier molécula que puede tratar o detener la degradación ósea o bien estimulando la proliferación de osteoblastos o bien inhibiendo la proliferación de osteoclastos. Los ejemplos ilustrativos de 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.

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

- “Moduladores del receptor de estrógenos” (SERM) se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de estrógenos al receptor, independientemente del mecanismo. Los ejemplos de moduladores del receptor de

estrógenos incluyen, entre otros, los estrógenos progestágeno, estradiol, droloxifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, TSE-424, tamoxifeno, idoxifeno, LY353381, LY117081, toremifeno, fulvestrant, 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-2H-1-benzopiran-3-il]-fenil-2,2-dimetilpropanoato 4,4'-dihidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenil-hidrazona y SH646.

- 5 - Calcitonina: inhibe directamente la actividad de 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 productos medicinales utilizados para la prevención y el tratamiento de enfermedades con resorción y reabsorción ósea tales como osteoporosis y cáncer con metástasis ósea, siendo este último con o sin hipercalcemia, asociadas al cáncer de mama y al cáncer de próstata. Los ejemplos de bisfosfonatos que pueden utilizarse en la terapia diseñada por medio del quinto método de la invención incluyen, aunque no se limitan a, bisfosfonatos nitrogenados (tales como pamidronato, neridronato, olpadronato, alendronato, ibandronato, risedronato, incadronato, zoledronato o ácido zoledrónico, etc.) y bisfosfonatos no nitrogenados (tales como etidronato, clodronato, tiludronato, etc.).
- 10 - "Inhibidores de catepsina K" se refiere a compuestos que interfieren en la actividad de la catepsina K cisteína proteasa. Los ejemplos no limitativos de inhibidores de catepsina K incluyen derivados de 4-amino-pirimidin-4-carbonitrilo (descritos en la solicitud de patente internacional WO 03/020278 a nombre de Novartis Pharma GMBH), pirrolo-pirimidinas descritas en la publicación WO 03/020721 (Novartis Pharma GMBH) y la publicación WO 04/000843 (ASTRAZENECA AB), así como los inhibidores descritos en las publicaciones PCT WO 00/55126 de Axys Pharmaceuticals, WO 01/49288 de Merck Frosst Canada & Co. y Axys Pharmaceuticals.
- 15 - "Inhibidor de DKK-1 (Dickkopf-1)" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que puede reducir la actividad de DKK-1. DKK-1 es un antagonista de la ruta de Wnt soluble expresado predominantemente en hueso de adulto y regulado por incremento en pacientes con mieloma con lesiones osteolíticas. Los agentes que seleccionan como diana DKK-1 pueden desempeñar un papel en prevenir 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 y por tanto inhibe la enfermedad osteolítica inducida por tumor (Ettenberg S. *et al.*, American Association for Cancer Research Annual Meeting. 12-16 de abril, 2008; San Diego, Calif. Resumen).
- 20 - "Inhibidor dual de MET y VEGFR2" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que es un potente inhibidor dual de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape de tumores impulsado por MET. El MET se expresa no sólo en células tumorales y células endoteliales, sino también en osteoblastos (células formadoras de hueso) y osteoclastos (células eliminadoras de hueso). El HGF se une a MET en todos estos tipos de células, otorgando un papel importante a la ruta de MET en múltiples bucles autocrinos y paracrinis. 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 características patológicas de metástasis óseas, incluyendo crecimiento óseo anómalo (es decir, lesiones blásticas) o destrucción (es decir, lesión lítica). Por tanto, seleccionar como diana la ruta de MET puede ser una estrategia viable en prevenir el establecimiento y la progresión de lesiones óseas metastásicas. El cabozantinib (Exelixis, Inc), anteriormente conocido como XL184 (CAS 849217-68-1), es un inhibidor dual potente de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape de tumores impulsado por MET. En múltiples estudios preclínicos, se ha mostrado que el cabozantinib destruye células tumorales, reduce las metástasis e inhibe la angiogénesis (la formación de vasos sanguíneos nuevos necesarios para apoyar el crecimiento del tumor). Otros inhibidores duales adecuados son E7050 ((2R,3R)-tartrato de N-[2-fluoro-4-({2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)]piperidin-1-il]carbonilaminopiridin-4-il}oxi)fenil]-N'-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxamida) (CAS 928037-13-2) o foretinib (también conocido como GSK1363089, XL880, CAS 849217-64-7).
- 30 - "Inhibidores de RANKL" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que puede reducir la actividad de RANK. El RANKL se encuentra en la superficie de la membrana de osteoblastos del estroma y las células de linfocitos T, y estas células de linfocitos T son las únicas que han demostrado la capacidad de secretarlo. Su principal función es la activación de los osteoclastos, células implicadas en la resorción ósea. Los inhibidores de RANKL pueden actuar bloqueando la unión de RANKL a su receptor (RANK), bloqueando la señalización mediada por RANK o reduciendo la expresión de RANKL bloqueando la transcripción o la traducción de RANKL. Los antagonistas o inhibidores de RANKL adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación:
 - o una proteína RANK adecuada que puede 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 murino o humano, o alternatively, puede usarse la forma madura de la proteína con el péptido señal eliminado.
 - o Osteoprotegerina o una variante de la misma con capacidad de unión a RANKL.
 - o Moléculas antisentido específicas de RANKL.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

○ Ribozimas que pueden 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 puede unirse específicamente al ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) inhibiendo una o más funciones de RANKL. Los anticuerpos pueden prepararse utilizando cualquiera de los métodos que conoce el experto en la técnica. Por tanto, los anticuerpos policlonales se preparan mediante la inmunización de un animal con la proteína que va a inhibirse. Los anticuerpos monoclonales se preparan 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 de unión a antígeno variable y una región constante, fragmentos "Fab", "F(ab')₂" y "Fab'", Fv, scFv, diacuerpos y anticuerpos biespecíficos.

○ Nanocuerpos anti-RANKL específicos. Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural. La tecnología de nanocuerpos se desarrolló originalmente después del descubrimiento de que los camélidos (camellos y llamas) poseen anticuerpos completamente funcionales que carecen de cadenas ligeras. La estructura general de los nanocuerpos es FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

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

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

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

En una realización preferida, el agente que previene la degradación ósea se selecciona del grupo que consiste en un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, un inhibidor de PTH y PTHLH o un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor dual de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógenos, radio-223, calcitonina, y un inhibidor de 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 la metástasis del tumor de cáncer de próstata 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. En algunas realizaciones, el antagonista de CCR5 es vicriviroc. En algunos aspectos, el antagonista de CCR5 es aplaviroc. 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 dual de MET y VEGFR2 se selecciona del grupo que consiste en cabozantinib, foretinib y E7050.

En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de mTor. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor es un inhibidor dual 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 (sirolimus), rapamicina (sirolimus), Abraxane (paclitaxel), Absorb (everolimus), Afinitor (everolimus), Afinitor con Gleevec, AS703026 (pimasertib), Axxess (umirrolimus), AZD2014, BEZ235, Biofreedom (umirrolimus), BioMatrix (umirrolimus), BioMatrix flex (umirrolimus), CC115, CC223, endoprótesis que eluye sirolimus diseñada por bioingeniería Combo ORBUSNEICH (sirolimus), Curaxin CBLC102 (mepacrina), DE109 (sirolimus), DS3078, Endeavor DES (zotarolimus),

Endeavor Resolute (zotarolimus), Femara (letrozol), Hocena (antroquinonol), INK128, Inspiron (sirolimus), IPI504 (clorhidrato de retaspimicina), KRN951 (tivozanib), ME344, MGA031 (teplizumab), MiStent SES (sirolimus), MKC1, Nobori (umirrolimus), OSI027, OVI123 (cordicepina), Palomid 529, PF04691502, Promus Element (everolimus), PWT33597, Rapamune (sirolimus), Resolute DES (zotarolimus), RG7422, SAR245409, SF1126, SGN75 (vorsetuzumab mafodotin), Synergy (everolimus), Taltorvic (ridaforolimus), Tarceva (erlotinib), Torisel (temsirolimus), Xience Prime (everolimus), Xience V (everolimus), Zomaxx (zotarolimus), Zortress (everolimus), endoprótesis periférica que eluye zotarolimus MEDTRONIC (zotarolimus), AP23841, AP24170, ARmTOR26, BN107, BN108, canstatina GENZYME (canstatina), CU906, EC0371, EC0565, KI1004, LOR220, NV128, rapamicina ONCOIMMUNE (sirolimus), SB2602, Sirolimus PNP SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS (sirolimus), TOP216, VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, Advacan (everolimus), AZD8055, endoprótesis coronaria que eluye sirolimus Cypher Select Plus (sirolimus), endoprótesis coronaria que eluye sirolimus Cypher (sirolimus), globo recubierto de fármaco (sirolimus), E-Magic Plus (sirolimus), Emtor (sirolimus), Esprit (everolimus), Evertor (everolimus), HBF0079, LCP-Siro (sirolimus), Limus CLARIS (sirolimus), inhibidor de mTor CELLZOME, endoprótesis coronaria que eluye sirolimus Nevo (sirolimus), nPT-mTOR, Rapacan (sirolimus), Renacept (sirolimus), Re-Zolve (sirolimus), Rocas (sirolimus), SF1126, Sirolim (sirolimus), Sirolimus NORTH CHINA (sirolimus), Sirolimus RANBAXY (sirolimus), Sirolimus WATSON (sirolimus) Siropan (sirolimus), Sirova (sirolimus), Supralimus (sirolimus), Supralimus-Core (sirolimus), tacrolimus WATSON (tacrolimus), TAF93, Temsirolimus ACCORD (temsirolimus), Temsirolimus SANDOZ (temsirolimus), TOP216, Xience Prime (everolimus), Xience V (everolimus). En un aspecto específico, el inhibidor de mTor es Afinitor (everolimus) (http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&Novald=4029462064338207963; consultada por última vez el 28/11/2012). En otro aspecto, el inhibidor de mTor puede identificarse a través de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Zhou, H. *et al.* Updates of mTor inhibitors. 2010. Anticancer Agents Med. Chem. 10(7): 571-81). En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se utiliza para tratar o prevenir o inhibir la metástasis en un paciente con cáncer de próstata avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se utiliza 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 cinasa Src. En algunos aspectos, el inhibidor de Src se utiliza para prevenir o inhibir la metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de cinasa Src se selecciona del grupo: AZD0530 (saracatinib), Bosulif (bosutinib), ENMD981693, KD020, KX01, Sprycel (dasatinib), Yervoy (ipilimumab), AP23464, AP23485, AP23588, AZD0424, Inhibidor de cinasa c-Src KISSEI, CU201, KX2361, SKS927, SRN004, SUNK706, TG100435, TG100948, AP23451, Dasatinib HETERO (dasatinib), Dasatinib VALEANT (dasatinib), Fontrax (dasatinib), inhibidor de cinasa Src KINEX, VX680, (tozasertib lactato), XL228, y SUNK706. En algunas realizaciones, el inhibidor de cinasa Src es dasatinib. En otro aspecto, los inhibidores de cinasa Src pueden identificarse a través de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sen, B. y Johnson, F.M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. 2011. J. Signal Transduction. 2011: 14 páginas). En algunos aspectos, el inhibidor de Cinasa Src se utiliza para tratar o prevenir o inhibir la metástasis en un paciente que es positivo para la firma sensible a SRC (SRS). En algunos aspectos, el inhibidor de cinasa Src se utiliza para tratar o prevenir o inhibir la metástasis en un paciente con cáncer de próstata avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de cinasa Src se utiliza 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 utiliza para prevenir o inhibir la metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se selecciona del grupo: ABT963, Acetaminofeno ER JOHNSON (acetaminofeno), Acular X (ketorolaco trometamina), BAY1019036 (aspirina), BAY987111 (difenhidramina, naproxeno sódico), BAY11902 (piroxicam), BCIBUCH001 (ibuprofeno), Capoxigem (apricoxib), CS502, CS670 (pelubipirofeno), Diclofenaco HPBCD (diclofenaco), Diractin (cetoprofeno), GW406381, HCT1026 (nitroflurbipirofeno), Hyanalges-D (diclofenaco), HydrocoDex (acetaminofeno, dextrometorfan, Hydrocodona), ibuprofeno sódico PFIZER (ibuprofeno sódico), Ibuprofeno con acetaminofeno PFIZER (acetaminofeno, ibuprofeno), Impracor (cetoprofeno), IP880 (diclofenaco), IP940 (indometacina), ISV205 (diclofenaco sódico), JNS013 (acetaminofeno, clorhidrato de tramadol), Cetoprofeno TDS (cetoprofeno), 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, cetoprofeno, clorhidrato de oximetazolina), Oralease (diclofenaco), Oxycodex (dextrometorfan, oxidodona), P54, Perco-Dex (acetaminofeno, dextrometorfan, oxidodona), PL3100 (naproxeno, fosfatidilcolina), PSD508, R-Cetoprofeno (cetoprofeno), Remura (bromfenaco sódico), ROX828 (ketorolaco trometamina), RP19583 (cetoprofeno lisina), RQ00317076, SDX101 (R-etodolaco), TDS943 (diclofenaco sódico), TDT070 (cetoprofeno), TPR100, TQ1011 (cetoprofeno), TT063 (S-flurbipirofeno), 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 PM, Acular X, Acuvail, Advil, Advil sinusitis alérgica, Advil resfriado y sinusitis, Advil alivio de la congestión, Advil PM, Advil PM cápsulas, Airtal, NyQuil libre de alcohol alivio del resfriado y de la gripe, Aleve, Aleve ABDI IBRAHIM, Aleve-D, Alka-Seltzer, Alka-Seltzer BAYER, Alka-Seltzer concentración extra, Alka-Seltzer lima-limón, Alka-Seltzer Original, Alka-Seltzer Plus, Alka-Seltzer Plus resfriado y tos, Alka-Seltzer plus fórmula para el resfriado y la tos, Alka-Seltzer Plus fórmula diurna y nocturna para el resfriado, Alka-Seltzer Plus fórmula diurna para el

resfriado que no produce somnolencia, Alka-Seltzer Plus fórmula para la gripe, Alka-Seltzer Plus fórmula nocturna para el resfriado, Alka-Seltzer Plus fórmula para la sinusitis, Alka-Seltzer Plus fórmula original efervescente para el resfriado, Alka-Seltzer PM, Alka-Seltzer para la resaca, Anacin, Anaprox, Anaprox MINERVA, Ansaid, apitoxina, Apranax, Apranax abdi, Arcoxia, fórmula para la artritis Bengay, Arthrotec, Asacol, Asacol HD, Asacol MEDUNA

5 ARZNEIMITTEL, Asacol ORIFARM, Aspirina de BAYER, Aspirina Complex, Aspirina Migran, AZD3582, Azulfidina, Baralgan M, BAY1019036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001, Benadryl alergia, Benadryl día y noche, Benylin 4 gripe, Benylin resfriado y gripe, Benylin día y noche resfriado y gripe, Benylin día y noche resfriado y sinusitis, Benylin Plus resfriado y sinusitis, Benylin día y alivio nocturno del resfriado y de la gripe, Benylin1 todo en uno, Brexin, Brexin ANGELINI, Bromday, Bufferin, Buscopan Plus, Caldolor, Calmatel, Cambia, Canasa, Capoxigem,

10 Cataflam, Celebrex, Celebrex ORIFARM, Advil sinusitis alérgica para niños, Tylenol para niños, Tylenol tos y moqueo nasal para niños, Tylenol Plus resfriado para niños, Tylenol Plus resfriado y tos para niños, Tylenol Plus resfriado y congestión nasal para niños, Tylenol Plus gripe para niños, Tylenol Plus resfriado y alergia para niños, Tylenol Plus tos y moqueo nasal para niños, Tylenol Plus tos y dolor de garganta para niños, Tylenol Plus múltiples síntomas de resfriado para niños, Cloniril, Codral resfriado y gripe, Codral comprimidos diurnos y nocturnos, Codral para la noche, Colazal, Combunox, Contac resfriado y gripe, Contac resfriado y gripe que no produce somnolencia, Coricidin D, Coricidin HBP resfriado y gripe, Coricidin HBP día y noche múltiples síntomas de resfriado, Coricidin HBP gripe de concentración máxima, Coricidin HBP noche múltiples síntomas de resfriado, Coricidin II resfriado y gripe de concentración extra, CS502, CS670, Daypro, Daypro Alta, DDS06C, Demazin resfriado y gripe, Demazin tos, resfriado y gripe, Demazin día/noche resfriado y gripe, Demazin PE resfriado y gripe, Demazin PE día/noche

20 resfriado y gripe, Diclofenaco HPBCD, Dimetapp alivio durante el día, Dimetapp múltiples síntomas de resfriado y gripe, Dimetapp alivio nocturno, Dimetapp alivio de dolor y fiebre, Dimetapp PE dolor sinusal, Dimetapp PE dolor sinusal y alergia, Dipentum, Diractin, Disprin resfriado y fiebre, Disprin Extra, Disprin Forte, Disprin Plus, Dristan resfriado, Dristan Junior, Drixoral Plus, Duexis, Dynastat, Efferalgan, Efferalgan Plus Vitamina C, Efferalgan Vitamina C, Elixsure IB, Excedrin espalda y cuerpo, Excedrin migraña, Excedrin PM, Excedrin cefalea sinusal, Excedrin cefalea tensional, Falcol, Fansamac, Feldene, FeverAll, Fiorinal, Fiorinal con Codeína, Flanax, parche Flector, Flucam, Fortagesic, Gerbin, Giazio, Gladio, Goody's dolor de espalda y cuerpo, Goody's naranja refrescante, Goody's concentración extra, 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, Indometacin APP PHARMA, Indometacin MYLAN, Tylenol infantil, IP880, IP940, Iremod, ISV205,

30 JNS013, Jr. Tylenol, Junifen, Advil concentración para niños, Motrin concentración para niños, Cetoprofeno TDS, Lemsip Max, Lemsip Max todo en uno, Lemsip Max toda la noche, Lemsip Max resfriado y gripe, Lialda, Listerine enjuague bucal, Lloyds crema, Lodine, Lorfit P, Loxonin, LTNS001, Mersyndol, Mesalamina SALIX, Mesalamina SOFAR, Mesalazina, Mesasal GLAXO, Mesasal SANOFI, Mesulid, Metsal Heat Rub, Midol Complete, Midol alivio prolongado, Midol geles líquidos, Midol PM, Midol fórmula para adolescentes, Migranin COMPRIMIDOS RECUBIERTOS, ML3000, Mobic, Mohrus, Motrin, Motrin dolor de resfriado y sinusitis, 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 resfriado y gripe, Nurofen migraña de concentración máxima, Nurofen Plus, Nuromol, NyQuil con Vitamina C, Ocufero, OMS103HP, Oralease, Orudis ABBOTT JAPAN, Oruvail, Osteluc, OxycoDex, P54, Panadol, Panadol Actifast, Paradine, Paramax, Parfenac, Pedeia, Pennsaid, Pentasa, Pentasa ORIFARM, Peon, Percodan, Percodan-Demi, PercoDex, Percogesic, Perfalgan, PL2200, PL3100, Ponstel, Prexige, Prolensa, PSD508, R-Cetoprofeno, Rantudil, Relafeno, Remura, Robaxisal, Rotec, Rowasa, ROX828, RP19583, RQ00317076, Rubor, Salofalk, Salonpas, Saridon, SDX101, Seltouch, sffRowasa, Shinbaro, Sinumax, Sinutab, Sinutab sinusitis, Spalt, Sprix, Strefen, Sudafed resfriado y tos, Sudafed Head resfriado y sinusitis, Sudafed PE resfriado y tos,

45 Sudafed PE presión y dolor, Sudafed PE, resfriado grave, Sudafed PE comprimidos para el día de alivio diurno y nocturno de la sinusitis, Sudafed PE comprimidos para la noche para alivio diurno y nocturno de la sinusitis, Sudafed PE alivio del dolor sinusal y antiinflamatorio, Sudafed Sinus Advance, Surgam, Synalgos-DC, Synflex, Tavist alergia/sinusitis/cefalea, TDS943, TDT070, Theraflu resfriado y dolor de garganta, Theraflu para el día resfriado grave y tos, Theraflu alivio con calor durante el día, Theraflu comprimidos oblongos para alivio con calor para el día múltiples síntomas de resfriado, Theraflu alivio con calor del resfriado y congestión del pecho, Thomapyrin, Thomapyrin C, Thomapyrin efervescente, Thomapyrin Medium, Tilcotil, Tispol, Tolectin, Toradol, TPR100, TQ1011, Trauma-Salbe, Trauma-Salbe Kwizda, Treo, Treximet, Trovex, TT063, Tylenol, Tylenol múltiples síntomas de alergia, Tylenol dolor de espalda, Tylenol resfriado y tos para el día, Tylenol resfriado y tos para la noche, Tylenol resfriado y sinusitis para el día, Tylenol resfriado y sinusitis para la noche, Tylenol para el resfriado, dolor de cabeza y congestión grave, Tylenol múltiples síntomas de resfriado para el día, Tylenol múltiples síntomas resfriado de para la noche líquido, Tylenol múltiples síntomas de resfriado grave, Tylenol fórmula que no produce somnolencia para el resfriado, Tylenol congestión de resfriado grave para el día, Tylenol resfriado completo, tos y gripe para la noche, Tylenol gripe para la noche, Tylenol menstrual, Tylenol PM, Tylenol congestión sinusal y dolor para el día, Tylenol congestión sinusal y dolor para la noche, Tylenol congestión sinusal y dolor intenso, Tylenol congestión sinusal severa para el día, Tylenol Ultra alivio, Tylenol con fosfato de cafeína y codeína, Tylenol con fosfato de codeína, Crema Bengay ultra concentrada, Ultracet, UR8880, V0498TA01A, Vicks NyQuil alivio del resfriado y de la gripe, Vicoprofen, Vimovo, Voltaren Emulgel, Voltaren GEL, Voltaren NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH, Voltaren XR, VT122, Xefo, Xefo Rapid, Xefocam, Xibrom, XL3, Xodol, XP20B, XP21B, XP21L, Zipsor y Zoenasa. En otro aspecto, los inhibidores de COX-2 pueden identificarse a través de métodos conocidos en la técnica (véase, *por ejemplo*, Dannhardt, G. y Kiefer, W. Ciclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. 2001. Eur. J. Med. Chem. 36: 109-126). En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se utiliza para tratar o prevenir o inhibir la

65

metástasis en un paciente con cáncer de próstata avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se utiliza 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 utiliza 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; consultada 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).

En una realización, el tratamiento es radio 223. En una realización preferida la terapia con radio 223 es Alpharadin (también conocido como Xofigo) (dicloruro de radio-223). Alpharadin utiliza radiación alfa de la desintegración del radio-223 para destruir células cancerígenas. 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 intervalo muy corto de 2-10 células (en comparación con la radioterapia actual que se basa en radiación beta o gamma), y por tanto, provoca menos daño a los tejidos sanos circundantes (particularmente la médula ósea). Con propiedades similares al calcio, el radio-223 se dirige a lugares donde el calcio se utiliza para formar huesos en el cuerpo, que incluye el sitio de crecimiento óseo anómalo más rápido, 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 el tumor primario. Algunas de estas células pueden desprenderse y ser transportadas en el torrente sanguíneo a otra parte del cuerpo. Las células cancerígenas pueden entonces asentarse en esa parte del cuerpo y formar un nuevo tumor. Si esto ocurre, se denomina cáncer secundario o metástasis. La mayoría de los pacientes con cáncer de próstata en estadio avanzado padecen la carga máxima de enfermedad en sus huesos. El objetivo con el radio-223 es seleccionar como diana selectivamente este cáncer secundario. Cualquier radio-223 no absorbido en los huesos se dirige rápidamente al intestino y se excreta.

Alternativamente, puede llevarse a cabo un tratamiento combinado en el que más de un agente de aquellos mencionados anteriormente se combinan 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.

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

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

- La quimioterapia es el uso de medicamentos para destruir células cancerígenas. Los medicamentos se administran generalmente por vía oral o vía intravenosa. Algunas veces, la quimioterapia se utiliza junto con el tratamiento de radiación.

- La terapia hormonal se basa en el hecho de que algunas hormonas promueven el crecimiento del cáncer. Por ejemplo, el estrógeno en mujeres producido por los ovarios a veces promueve el crecimiento del cáncer de mama. Hay varias formas de detener la producción de estas hormonas. Una forma es extirpar los órganos que las producen: los ovarios en el caso de mujeres, los testículos en el caso de los hombres. Más frecuentemente, pueden utilizarse los medicamentos para prevenir que estos órganos produzcan las hormonas o para prevenir que las hormonas actúen en las células cancerígenas.

- La inmunoterapia es un tratamiento que ayuda al sistema inmunológico del paciente a combatir el cáncer. Hay varios tipos de inmunoterapia que se utilizan para tratar pacientes con metástasis. Estos incluyen, pero no se limitan a, citocinas, anticuerpos monoclonales y vacunas antitumorales.

Método para diseñar terapia personalizada de la invención en pacientes con cáncer de próstata con metástasis ósea

Los pacientes que padecen cáncer de próstata que ya ha metastatizado al hueso y en los que hay niveles elevados de c-MAF pueden beneficiarse particularmente de terapias dirigidas a prevenir la degradación ósea provocada por la actividad osteoclástica aumentada.

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

determinar si el gen c-MAF se amplifica en una muestra tumoral de dicho sujeto en relación con un número de copias génicas de referencia, en el que una amplificación del gen c-MAF con respecto al número de copias génicas de referencia indica que el sujeto es un candidato para recibir clodronato.

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

la invención.

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

El tercer método de la invención comprende en una primera etapa, cuantificar la amplificación del gen c-MAF en una muestra tumoral en un sujeto que padece cáncer de próstata. En una realización particular del tercer método de la invención, la muestra es una muestra de tejido de metástasis ósea.

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

En una segunda etapa, la amplificación del gen c-MAF obtenido en la muestra tumoral del sujeto se compara con la amplificación de dicho gen en una muestra de control. La determinación de la amplificación del gen c-MAF debe correlacionarse con los valores de una muestra de control o muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor que va a analizarse, la naturaleza exacta de la muestra de control puede variar. Por tanto, en el caso que implica el tercer método de la invención, la muestra de referencia es entonces una muestra de tejido tumoral de un sujeto con cáncer de próstata que no ha padecido metástasis o que corresponde a la mediana del valor de la amplificación del gen c-MAF medido en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de próstata que no han padecido metástasis.

Una vez que se ha medido la amplificación del gen c-MAF en la muestra y se ha comparado con la muestra de control, si la amplificación de dicho gen está aumentada con respecto a su número de copias en la muestra de control, entonces puede concluirse que dicho sujeto es susceptible de recibir clodronato.

Tal como se usa en el presente documento, un "agente para evitar o prevenir la degradación ósea" se refiere a cualquier molécula que puede tratar o detener la degradación ósea o bien estimulando la proliferación del osteoblasto o bien inhibiendo la proliferación del osteoclasto. Los ejemplos ilustrativos de 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 acción dual" (DABA) porque estimulan la proliferación de osteoblastos e inhiben la proliferación de osteoclastos.

- "Moduladores del receptor de estrógenos" (SERM) se refiere a compuestos que interfieren o inhiben la unión de estrógenos al receptor, independientemente del mecanismo. Los ejemplos de moduladores del receptor de estrógenos incluyen, entre otros, estrógenos progestágenos, estradiol, droloxifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, TSE-424, tamoxifeno, idoxifeno, LY353381, LY117081, toremifeno, fulvestrant, 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]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 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 productos medicinales utilizados para la prevención y el tratamiento de enfermedades con resorción y reabsorción ósea tales como osteoporosis y cáncer con metástasis ósea, siendo este último con o sin hipercalcemia, asociadas al cáncer de mama y al cáncer de próstata. Los ejemplos de bisfosfonatos que pueden utilizarse en la terapia diseñada por medio del quinto método de la invención incluyen, aunque no se limitan a, bisfosfonatos nitrogenados (tales como pamidronato, neridronato, olpadronato, alendronato, ibandronato, risedronato, incadronato, zoledronato o ácido zoledrónico, etc.) y bisfosfonatos no nitrogenados (tales como etidronato, clodronato, tiludronato, etc.).

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

- "Inhibidor de DKK-1 (Dickkopf-1)" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que puede reducir la actividad de DKK-1. El DKK-1 es un antagonista de la ruta de Wnt soluble expresado predominantemente en hueso de adulto y regulado por incremento en pacientes con mieloma con lesiones osteolíticas. Los agentes que seleccionan como diana DKK-1 pueden desempeñar un papel en prevenir 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 y por tanto inhibe la enfermedad osteolítica inducida por tumor (Ettenberg S. *et al.*, American Association for Cancer Research Annual Meeting. 12-16 de abril, 2008; San Diego, Calif. Resumen).

- "Inhibidor dual de MET y VEGFR2" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto que es un potente inhibidor dual de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape de tumores impulsado por MET. El MET se expresa no sólo en células tumorales y células endoteliales, sino también en osteoblastos (células formadoras de hueso) y osteoclastos (células eliminadoras de hueso). El HGF se une a MET en todos estos tipos de célula, otorgando un papel importante a la ruta de MET 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 características patológicas de metástasis óseas, que incluyen crecimiento óseo anómalo (es decir, lesiones blásticas) o destrucción (es decir, lesión lítica). Por tanto, seleccionar como diana la ruta de MET puede ser una estrategia viable en prevenir el establecimiento y la progresión de lesiones óseas metastásicas. El cabozantinib (Exelixis, Inc), anteriormente conocido como XL184 (CAS 849217-68-1), es un inhibidor dual potente de las rutas de MET y VEGF diseñado para bloquear el escape de tumores impulsado por MET. En múltiples estudios preclínicos, se ha demostrado que el cabozantinib destruye células tumorales, reduce las metástasis e inhibe la angiogénesis (la formación de vasos sanguíneos nuevos necesarios para apoyar el crecimiento del tumor). Otros inhibidores duales adecuados son E7050 ((2R,3R)-tartrato de N-[2-fluoro-4-({2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonilaminopiridin-4-il}oxi)fenil]-N'-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxamida) (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 puede reducir la actividad de RANK. El RANKL se encuentra en la superficie de la membrana de osteoblastos del estroma y las células de linfocitos T, y estas células de linfocitos T son las únicas que han demostrado la capacidad de secretarlo. Su principal función es la activación de los osteoclastos, células implicadas en la resorción ósea. Los inhibidores de RANKL pueden actuar bloqueando la unión de RANKL a su receptor (RANK), bloqueando la señalización mediada por RANK o reduciendo la expresión de RANKL bloqueando la transcripción o la traducción de RANKL. Los antagonistas o inhibidores de RANKL adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación:

- una proteína RANK adecuada que puede unirse a RANKL y que comprende la totalidad o un fragmento del dominio extracelular de una proteína RANK. El RANK soluble puede comprender el péptido señal y el dominio extracelular de los polipéptidos RANK murino o humano, o alternativamente, puede usarse la forma madura de la proteína con el péptido señal eliminado.

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

- Moléculas antisentido específicas de RANKL.

- Ribozimas que pueden procesar los productos transcritos de RANKL.

- Anticuerpos anti-RANKL específicos. "Anticuerpo anti-RANKL o anticuerpo dirigido contra RANKL" se entiende en el presente documento como todo aquel anticuerpo que puede unirse específicamente al ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) inhibiendo una o más funciones de RANKL. Los anticuerpos pueden prepararse utilizando cualquiera de los métodos que conoce el experto en la técnica. Por tanto, los anticuerpos policlonales se preparan mediante la inmunización de un animal con la proteína que va a inhibirse. Los anticuerpos monoclonales se preparan 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 de unión a antígeno variable y una región constante, fragmentos "Fab", "F(ab')₂" y "Fab'", Fv, scFv, diacuerpos y anticuerpos biespecíficos.

- Nanocuerpos anti-RANKL específicos. Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural. La tecnología de nanocuerpo se desarrolló originalmente después del descubrimiento de que los camélidos (camellos y llamas) poseen anticuerpos completamente funcionales que carecen de cadenas ligeras. La estructura general de los nanocuerpos es FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

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

En un aspecto, el inhibidor de RANKL se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo específico de RANKL,

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

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

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

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

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

En otro aspecto, el tratamiento es un inhibidor de mTor. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor es un inhibidor dual 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 (sirolimus), rapamicina (sirolimus), Abraxane (paclitaxel), Absorb (everolimus), Afinitor (everolimus), Afinitor con Gleevec, AS703026 (pimasertib), Axxess (umirolium), AZD2014, BEZ235, Biofreedom (umirolium), BioMatrix (umirolium), BioMatrix flex (umirolium), CC115, CC223, endoprótesis que eluye sirolimus diseñada por bioingeniería Combo ORBUSNEICH (sirolimus), Curaxin CBLC102 (mepacrina), DE109 (sirolimus), DS3078, Endeavor DES (zotarolimus), Endeavor Resolute (zotarolimus), Femara (letrozol), Hocena (antroquinonol), INK128, Inspiron (sirolimus), IPI504 (clorhidrato de retaspimicina), KRN951 (tivozanib), ME344, MGA031 (teplizumab), MiStent SES (sirolimus), MKC1, Nobori (umirolium), OSI027, OVI123 (cordicepina), Palomid 529, PF04691502, Promus Element (everolimus), PWT33597, Rapamune (sirolimus), Resolute DES (zotarolimus), RG7422, SAR245409, SF1126, SGN75 (vorsetuzumab mafodotin), Synergy (everolimus), Taltorvic (ridaforolimus), Tarceva (erlotinib), Torisel (temsirolimus), Xience Prime (everolimus), Xience V (everolimus), Zomaxx (zotarolimus), Zortress (everolimus), endoprótesis periférica que eluye zotarolimus MEDTRONIC (zotarolimus), AP23841, AP24170, ARmTOR26, BN107, BN108, canstatina GENZYME (canstatina), CU906, EC0371, EC0565, KI1004, LOR220, NV128, rapamicina ONCOIMMUNE (sirolimus), SB2602, sirolimus PNP SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS (sirolimus), TOP216, VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, Advacan (everolimus), AZD8055, endoprótesis coronaria que eluye sirolimus Cypher Select Plus (sirolimus), endoprótesis coronaria que eluye sirolimus Cypher (sirolimus), globo recubierto de fármaco (sirolimus), E-Magic Plus (sirolimus), Emtor (sirolimus), Esprit (everolimus), Evertor (everolimus), HBF0079, LCP-Siro (sirolimus), Limus CLARIS (sirolimus), inhibidor de mTor CELLZOME, endoprótesis coronaria que eluye sirolimus Nevo (sirolimus), nPT-mTOR, Rapacan (sirolimus), Renacept (sirolimus), Re-Zolve (sirolimus), Rocas (sirolimus), SF1126, Sirolim (sirolimus), sirolimus NORTH CHINA (sirolimus), sirolimus RANBAXY (sirolimus), sirolimus WATSON (sirolimus), Siropam (sirolimus), Sirova (sirolimus), Supralimus (sirolimus), Supralimus-Core (sirolimus), tacrolimus WATSON (tacrolimus), TAF93, temsirolimus ACCORD (temsirolimus), temsirolimus SANDOZ (temsirolimus), TOP216, Xience Prime (everolimus), Xience V (everolimus). En un aspecto específico, el inhibidor de mTor es Afinitor (everolimus) (http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&Novald=4029462064338207963; consultada por última vez el 28/11/2012). En otro aspecto, los inhibidores de mTor pueden identificarse a través de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Zhou, H. *et al.* Updates of mTor inhibitors. 2010. *Anticancer Agents Med. Chem.* 10(7): 571-81). En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se utiliza para tratar o prevenir o inhibir la metástasis en un paciente con cáncer de próstata avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de mTor se utiliza 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 cinasa Src. En algunos aspectos, el inhibidor de Src se utiliza para prevenir o inhibir la metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de cinasa Src se selecciona del grupo: AZD0530 (saracatinib), Bosulif (bosutinib), ENMD981693, KD020, KX01, Sprycel (dasatinib), Yervoy (ipilimumab), AP23464, AP23485, AP23588, AZD0424, inhibidor de cinasa c-Src KISSEI, CU201, KX2361, SKS927, SRN004, SUNK706, TG100435, TG100948, AP23451, dasatinib HETERO (dasatinib), dasatinib VALEANT (dasatinib), Fontrax (dasatinib), inhibidor de cinasa Src KINEX, VX680, (tozasertib lactato), XL228, y SUNK706. En algunos aspectos, el inhibidor de cinasa Src es dasatinib. En otro aspecto, los inhibidores de cinasa Src pueden identificarse a través de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sen, B. y Johnson, F.M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. 2011. J. Signal Transduction. 2011: 14 páginas). En algunos aspectos, el inhibidor de cinasa Src se utiliza para tratar o prevenir o inhibir la metástasis en un paciente que es positivo para la firma sensible a SRC (SRS). En algunos aspectos, el inhibidor de cinasa Src se utiliza para tratar o prevenir o inhibir la metástasis en un paciente con cáncer de próstata avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de cinasa Src se utiliza 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 utiliza para prevenir o inhibir la metástasis. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se selecciona del grupo: ABT963, acetaminofeno ER JOHNSON (acetaminofeno), Acular X (ketorolaco trometamina), BAY1019036 (aspirina), BAY987111 (difenhidramina, naproxeno sódico), BAY11902 (piroxicam), BCIBUCH001 (ibuprofeno), Capoxigem (apricoxib), CS502, CS670 (pelubiprofeno), diclofenaco HPBCD (diclofenaco), Diractin (cetoprofeno), GW406381, HCT1026 (nitroflurbiprofeno), Hyanalgese-D (diclofenaco), HydrocoDex (acetaminofeno, dextrometorfano, Hydrocodona), ibuprofeno sódico PFIZER (ibuprofeno sódico), ibuprofeno con acetaminofeno PFIZER (acetaminofeno, ibuprofeno), Impracor (cetoprofeno), IP880 (diclofenaco), IP940 (indometacina), ISV205 (diclofenaco sódico), JNS013 (acetaminofeno, clorhidrato de tramadol), cetoprofeno TDS (cetoprofeno), 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, cetoprofeno, clorhidrato de oximetazolina), Oralease (diclofenaco), OxycoDex (dextrometorfano, oxicodona), P54, Perco-Dex (acetaminofeno, dextrometorfano, oxicodona), PL3100 (naproxeno, fosfatidilcolina), PSD508, R-cetoprofeno (cetoprofeno), Remura (bromfenaco sódico), ROX828 (ketorolaco trometamina), RP19583 (cetoprofeno lisina), RQ00317076, SDX101 (R-etodolaco), TDS943 (diclofenaco sódico), TDT070 (cetoprofeno), TPR100, TQ1011 (cetoprofeno), 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 sinusitis alérgica, Advil resfriado y sinusitis, Advil alivio de la congestión, Advil PM, Advil PM cápsulas, Air Salonas, Airtal, NyQuil libre de alcohol alivio del resfriado y de la gripe, Aleve, Aleve ABDI IBRAHIM, Aleve-D, Alka-Seltzer, Alka-Seltzer BAYER, Alka-Seltzer concentración extra, Alka-Seltzer lima-limón, Alka-Seltzer Original, Alka-Seltzer Plus, Alka-Seltzer Plus resfriado y tos, Alka-Seltzer plus fórmula para el resfriado y la tos, Alka-Seltzer Plus fórmula diurna y nocturna para el resfriado, Alka-Seltzer Plus fórmula diurna para el resfriado que no produce somnolencia, Alka-Seltzer Plus fórmula para la gripe, Alka-Seltzer Plus fórmula nocturna para el resfriado, Alka-Seltzer Plus fórmula para la sinusitis, Alka-Seltzer Plus fórmula original efervescente para el resfriado, Alka-Seltzer PM, Alka-Seltzer para la resaca, Anacin, Anaprox, Anaprox MINERVA, Ansaid, apitoxina, Apranax, Apranax abdi, Arcoxia, fórmula para la artritis Bengay, Arthrotec, Asacol, Asacol HD, Asacol MEDUNA ARZNEIMITTEL, Asacol ORIFARM, Aspirina de BAYER, Aspirina Complex, Aspirina Migran, AZD3582, Azulfidina, Baralgan M, BAY1019036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001, Benadryl alergia, Benadryl día y noche, Benylin 4 gripe, Benylin resfriado y gripe, Benylin día y noche resfriado y gripe, Benylin día y noche resfriado y sinusitis, Benylin Plus resfriado y sinusitis, Benylin alivio diurno y nocturno del resfriado y de la gripe, Benylin1 todo en uno, Brexin, Brexin ANGELINI, Bromday, Bufferin, Buscopan Plus, Caldolor, Calmatel, Cambia, Canasa, Capoxigem, Cataflam, Celebrex, Celebrex ORIFARM, Advil sinusitis alérgica para niños, Tylenol para niños, Tylenol Plus resfriado y gripe, Tylenol Plus resfriado y gripe, Tylenol Plus resfriado y tos para niños, Tylenol Plus resfriado y congestión nasal para niños, Tylenol Plus gripe para niños, Tylenol Plus resfriado y alergia para niños, Tylenol Plus tos y moqueo nasal para niños, Tylenol Plus tos y dolor de garganta para niños, Tylenol Plus múltiples síntomas de resfriado para niños, Clinoril, Codral resfriado y gripe, Codral comprimidos diurnos y nocturnos, Codral para la noche, Colazal, Combunox, Contac resfriado y gripe, Contac resfriado y gripe que no produce somnolencia, Coricidin D, Coricidin HBP resfriado y gripe, Coricidin HBP día y noche múltiples síntomas de resfriado, Coricidin HBP gripe de concentración máxima, Coricidin HBP noche múltiples síntomas de resfriado, Coricidin II resfriado y gripe de concentración extra, CS502, CS670, Daypro, Daypro Alta, DDS06C, Demazin resfriado y gripe, Demazin tos, resfriado y gripe, Demazin día/noche resfriado y gripe, Demazin PE resfriado y gripe, Demazin PE día/noche resfriado y gripe, Diclofenaco HPBCD, Dimetapp alivio durante el día, Dimetapp múltiples síntomas de resfriado y gripe, Dimetapp alivio nocturno, Dimetapp alivio de dolor y fiebre, Dimetapp PE dolor sinusal, Dimetapp PE dolor sinusal y alergia, Dipentum, Diractin, Disprin resfriado y fiebre, Disprin Extra, Disprin Forte, Disprin Plus, Dristan resfriado, Dristan Junior, Drixoral Plus, Duexis, Dynastat, Efferalgan, Efferalgan Plus Vitamina C, Efferalgan Vitamina C, Elixure IB, Excedrin espalda y cuerpo, Excedrin migraña, Excedrin PM, Excedrin cefalea sinusal, Excedrin cefalea tensional, Falcol, Fansamac, Feldene, FeverAll, Fiorinal, Fiorinal con Codefina, Flanax, parche Flector, Flucam, Fortagesic, Gerbin, Giazio, Gladio, Goody's dolor de espalda y cuerpo, Goody's naranja refrescante, Goody's concentración extra, 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, Indometacin APP PHARMA, Indometacin MYLAN, Tylenol infantil, IP880, IP940, Iremod, ISV205, JNS013, Jr. Tylenol, Junifen, Advil concentración para niños, Motrin concentración para niños, Cetoprofeno TDS, Lemsip Max, Lemsip Max todo en uno, Lemsip Max toda la noche, Lemsip Max resfriado y gripe, Lialda, Listerine enjuague bucal, crema Lloyds, Lodine, Lorfit P, Loxonin, LTNS001, Mersyndol, Mesalamina SALIX, Mesalamina SOFAR, Mesalazina, Mesasal GLAXO, Mesasal SANOFI, Mesulid, Metsal Heat Rub, Midol Complete, Midol alivio prolongado, Midol geles líquidos, Midol PM, Midol fórmula para adolescentes, Migranin COMPRIMIDOS RECUBIERTOS, ML3000, Mobic, Mohrus, Motrin, Motrin dolor de resfriado y sinusitis, 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 resfriado y gripe, Nurofen migraña de concentración máxima, Nurofen Plus, Nuromol, NyQuil con Vitamina C, Ocufero, OMS103HP, Oralease, Orudis ABBOTT JAPAN, Oruvail, Osteluc, OxycoDex, P54, Panadol, Panadol Actifast, Paradine, Paramax, Parfenac, Pedeas, Pennsaid, Pentasa, Pentasa ORIFARM, Peon, Percodan, Percodan-Demi, PercoDex, Percogesic, Perfalgan, PL2200, PL3100, Ponstel, Prexige, Prolensa, PSD508, R-Cetoprofeno, Rantudil, Relafeno, Remura, Robaxial, Rotec, Rowasa, ROX828, RP19583, RQ00317076, Rubor, Salofalk, Salonpas, Saridon, SDX101, Seltouch, sRowasa, Shinbaro, Sinumax, Sinutab, Sinutab sinusitis, Spalt, Sprix, Strefen, Sudafed resfriado y tos, Sudafed Head resfriado y sinusitis, Sudafed PE resfriado y tos, Sudafed PE presión y dolor, Sudafed PE, resfriado grave, Sudafed PE comprimidos para el día de alivio diurno y nocturno de la sinusitis, Sudafed PE comprimidos para la noche para alivio diurno y nocturno de la sinusitis, Sudafed PE alivio del dolor sinusal y antiinflamatorio, Sudafed Sinus Advance, Surgam, Synalgos-DC, Synflex, Tavist alergia/sinusitis/cefalea, TDS943, TDT070, Theraflu resfriado y dolor de garganta, Theraflu diurno para resfriado grave y tos, Theraflu alivio con calor durante el día, Theraflu comprimidos oblongos para alivio con calor para el día de múltiples síntomas de resfriado, Theraflu alivio con calor del resfriado y congestión del pecho, Thomapyrin, Thomapyrin C, Thomapyrin efervescente, Thomapyrin Medium, Tilcotil, Tispol, Tolectin, Toradol, TPR100, TQ1011, Trauma-Salbe, Trauma-Salbe Kwizda, Treo, Treximet, Trovex, TT063, Tylenol, Tylenol múltiples síntomas de alergia, Tylenol dolor de espalda, Tylenol resfriado y tos para el día, Tylenol resfriado y tos para la noche, Tylenol resfriado y sinusitis para el día, Tylenol resfriado y sinusitis para la noche, Tylenol para el resfriado, dolor de cabeza y congestión grave, Tylenol múltiples síntomas de resfriado para el día, Tylenol líquido para la noche para los múltiples síntomas del resfriado, Tylenol múltiples síntomas de resfriado grave, Tylenol fórmula que no produce somnolencia para el resfriado, Tylenol congestión de resfriado grave para el día, Tylenol resfriado completo, tos y gripe para la noche, Tylenol gripe para la noche, Tylenol menstrual, Tylenol PM, Tylenol congestión sinusal y dolor para el día, Tylenol congestión sinusal y dolor para la noche, Tylenol congestión sinusal y dolor intenso, Tylenol congestión sinusal severa para el día, Tylenol Ultra alivio, Tylenol con fosfato de cafeína y codeína, Tylenol con fosfato de codeína, Crema Bengay ultra concentrada, Ultracet, UR8880, V0498TA01A, Vicks NyQuil alivio del resfriado y de la gripe, Vicoprofen, Vimovo, Voltaren Emulgel, Voltaren GEL, Voltaren NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH, Voltaren XR, VT122, Xefo, Xefo Rapid, Xefocam, Xibrom, XL3, Xodol, XP20B, XP21B, XP21L, Zipsor y Zoenasa. En otro aspecto, los inhibidores de COX-2 pueden identificarse a través de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Dannhardt, G. y Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. 2001. Eur. J. Med. Chem. 36: 109-126). En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se utiliza para tratar o prevenir o inhibir la metástasis en un paciente con cáncer de próstata avanzado. En algunos aspectos, el inhibidor de COX-2 se utiliza 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 utiliza 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; consultada 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).

En un aspecto, el tratamiento es radio 223. En un aspecto preferido la terapia con radio 223 es Alpharadin (también conocido como Xofigo) (dicloruro de radio-223). Alpharadin utiliza radiación alfa de la desintegración del radio-223 para destruir células cancerígenas. 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 intervalo muy corto de 2-10 células (en comparación con la radioterapia actual que se basa en radiación beta o gamma), y por tanto, provoca menos daño a los tejidos sanos circundantes (particularmente la médula ósea). Con propiedades similares al calcio, el radio-223 se dirige a lugares donde el calcio se utiliza para formar huesos en el cuerpo, que incluye el sitio de crecimiento óseo anómalo más rápido, 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 desprenderse y ser transportadas en el torrente sanguíneo a otra parte del cuerpo. Las células cancerígenas pueden entonces asentarse en esa parte del cuerpo y formar un nuevo tumor. Si esto ocurre, se denomina cáncer secundario o metástasis. La mayoría de los pacientes con cáncer de próstata en estadio avanzado padecen la carga máxima de enfermedad en sus huesos. El objetivo con el radio-223 es seleccionar como diana selectivamente este cáncer secundario. Cualquier radio-223 no absorbido en los huesos se dirige rápidamente al intestino y se excreta.

Alternativamente, puede llevarse a cabo un tratamiento combinado en el que más de un agente de aquellos mencionados anteriormente se combina 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 diagnóstico o pronóstico de metástasis en cáncer de próstata basado en detectar la amplificación del gen c-MAF

5 En un aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de metástasis en un sujeto con cáncer de próstata (a continuación en el presente documento, método de diagnóstico de la invención) y/o para el pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cáncer de próstata que comprende

(i) cuantificar la amplificación o el número de copias de c-MAF en una muestra de tumor de próstata de dicho sujeto y

10 (ii) comparar la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en (i) con la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en una muestra de control;

en el que si la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en dicha muestra tumoral está aumentado con respecto a la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en la muestra de control, entonces dicho sujeto tiene un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis.

15 Los términos “gen c-MAF”, “metástasis”, “muestra tumoral”, “cáncer de próstata”, “diagnóstico de metástasis en un sujeto con cáncer de próstata”, “pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cáncer de próstata”, “sujeto”, “paciente”, “sujeto que tiene un diagnóstico positivo de metástasis”, “sujeto que tiene una mayor tendencia a desarrollar metástasis” se han descrito en detalle en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables al cuarto método de la invención.

20 En una realización particular, el grado de amplificación del gen c-MAF puede determinarse determinando la amplificación de una región cromosómica que contiene dicho gen. Preferiblemente, la región cromosómica cuya amplificación es indicativa de la existencia de amplificación del gen c-MAF es el locus 16q22-q24, el cual incluye el gen c-MAF. 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 del NCBI con los cóntigos NT_010498.15 y NT_010542.15. En otra realización preferida, el grado de amplificación del gen c-MAF puede
25 determinarse utilizando una sonda específica para dicho gen.

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

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

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

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

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

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

MAF.

En algunas realizaciones, la amplificación está en la región del locus 16q23. En algunas realizaciones, la amplificación está en cualquier parte de la región cromosómica entre Chr. 16 – 79.392.959 pb y 79.663.806 pb (desde el centrómero hasta el telómero). En algunas realizaciones, la amplificación está en la región genómica entre Chr. 16 – 79.392.959 pb y 79.663.806 pb, pero excluyendo los elementos repetitivos del ADN. En algunas realizaciones, la amplificación se mide utilizando una sonda específica para esta región.

En una realización particular, la amplificación o el 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 de cromosomas 16q22-q24 están amplificados son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Dichos métodos incluyen, sin limitación, hibridación *in situ* (ISH) (tal como hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH), hibridación *in situ* cromogénica (CISH) o hibridación *in situ* con plata (SISH)), hibridación genómica comparativa o reacción en cadena de la polimerasa (tal como PCR cuantitativa en tiempo real). Para cualquier método ISH, la amplificación o el número de copias pueden determinarse contando el número de puntos fluorescentes, puntos coloreados o puntos con plata en los cromosomas o en el núcleo.

La hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) es una técnica citogenética que se utiliza para detectar y localizar la presencia o ausencia de secuencias de ADN específicas en cromosomas. La FISH utiliza sondas de fluorescencia que sólo se unen a algunas partes del cromosoma con las que muestran un alto grado de similitud de secuencia. En un método FISH típico, la sonda de ADN se marca con una molécula fluorescente o un hapteno, normalmente en la forma de flúor-dUTP, digoxigenina-dUTP, biotina-dUTP o hapteno-dUTP, la cual se incorpora en el ADN utilizando reacciones enzimáticas, tales como traslación de la muestra o PCR. La muestra que contiene el material genético (los cromosomas) se coloca en portaobjetos de vidrio y se desnaturaliza mediante un tratamiento con formamida. La sonda marcada se hibrida luego con la muestra que contiene el material genético en condiciones adecuadas que se determinarán 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 se marca con digoxigenina, biotina o fluoresceína, y se hibrida con la muestra que contiene el material genético en condiciones adecuadas.

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

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

La determinación de la amplificación del gen c-MAF necesita correlacionarse con 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 tejido tumoral de un sujeto con cáncer de próstata que no ha padecido metástasis o que corresponde a la mediana del valor de la amplificación del gen c-MAF medida en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de próstata que no han padecido 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 bien documentados clínicamente y en los que la ausencia de metástasis está bien caracterizada. La colección de muestras de la que se deriva el nivel de referencia estará compuesta preferiblemente por sujetos que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente objeto de estudio. Una vez que se ha establecido la mediana del valor, el nivel de amplificación de c-MAF en tejidos tumorales de pacientes puede compararse con esta mediana del valor, y por tanto, si hay amplificación, el sujeto tiene un diagnóstico positivo de metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis.

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

Método de pronóstico de metástasis en cáncer de próstata basado en detectar la translocación del gen c-MAF

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

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

- 10 En algunos aspectos, el gen translocado es de la región en el locus 16q23. En algunos aspectos, el gen translocado es de cualquier parte de la región cromosómica entre Chr. 16 – 79.392.959 pb y 79.663.806 pb (desde el centrómero hasta el telómero). En algunos aspectos, el gen translocado es de la región genómica entre Chr. 16 – 79.392.959 pb y 79.663.806 pb, pero excluyendo los elementos repetitivos del ADN. En algunos aspectos, la translocación se mide utilizando una sonda específica para esta región.

- 15 En un aspecto particular, la translocación del gen c-MAF puede determinarse determinando la translocación de una región de cromosomas que contiene dicho gen. En un aspecto, la translocación es la translocación t(14,16). En otro aspecto, la región de cromosomas 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 del NCBI con los cóntigos NT_010498.15 y NT_010542.15. En un aspecto preferido, el gen c-MAF se transloca al cromosoma 14 en el locus 14q32, dando como resultado la translocación t(14,16)(q32,q23). Esta translocación coloca el gen MAF junto a los potenciadores fuertes en el locus IgH, lo que, en algunos casos, conduce a la sobreexpresión de MAF. (Eychène, A., Rocques, N., y Puoponnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8: 683-693.)

- 20 En un aspecto preferido, la translocación del gen c-MAF puede determinarse utilizando una sonda específica para dicha translocación. En algunos aspectos, la translocación se mide utilizando una sonda de color dual. En algunos aspectos, la translocación se mide utilizando una sonda de fusión dual. En algunos aspectos, la translocación se mide utilizando una sonda de color y de fusión dual. En algunos aspectos, la translocación se mide utilizando dos sondas separadas.

- 25 En otro aspecto preferido, la translocación del gen c-MAF se determina utilizando la sonda de color y de fusión dual Vysis LSI IGH/MAF (<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-igh-maf-dual-color-dual-fusion-probe.html>; consultada por última vez el 5/11/2012), que comprende una sonda contra 14q32 y 16q23. En otros aspectos preferidos, la translocación del gen c-MAF se determina utilizando 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-ighgt1416-fusion-probe.html>; consultada por última vez el 5/11/2012), una sonda MAF FISH de Abnova (http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?Catalog_id=FA0375; consultada por última vez el 5/11/2012), una sonda de translocación de color y de fusión dual IGH/MAF de Cancer Genetics Italia (<http://www.cancergeneticsitalia.com/ADN-fish-probe/ighmaf/>; consultada 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>; consultada por última vez el 5/11/2012), un panel de mieloma múltiple de Arup Laboratories por FISH (<http://www.aruplab.com/files/technical-bulletins/Multiple%20Myeloma%20%28MM%29%20by%20FISH.pdf>; consultada por última vez el 5/11/2012), una sonda Agilent específica para 16q23 ó 14q32 (<http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?chr=16&start=79483700&end=79754340>; consultada por última vez el 5/11/2012); <http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?Pageid=3000&ProductID=637>; consultada por última vez el 5/11/2012), una sonda de Dako específica para 16q23 ó 14q32 (http://www.dako.com/us/ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?setCountry=true&purl=ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?undefined&submit=Accept%20country; consultada por última vez el 5/11/2012), una sonda de translocación y fusión dual Cytocell IGH/MAF (http://www.zentech.be/uploads/docs/products_info/prenatalogy/cytocell%202012-2013%20catalogue%5B3%5D.pdf; consultada por última vez el 5/11/2012), una sonda de translocación y fusión dual XL IGH/MAF de Metasystems (http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com_joobdb&view=article&joobase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272; consultada por última vez el 5/11/2012), una sonda XL Zeiss FISH, 100 µl, IGH/MAFB (<https://www.microshop.zeiss.com/?s=440675675dedc6&1=en&p=uk&f=r&i=5000&o=&h=25&n=1&sd=000000-0528-231-uk>; consultada por última vez el 5/11/2012) o una sonda de fusión dual Genycell Biotech IGH/MAF (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%2Fproducts%2Fbrochures%2Fiphmie6_86.ppt&ei=MhGYUOi3GKWH0QG1t4DoDw&usq=AFQjCNEqQMbT8vQGjJbi9riEf31VgoFTTFQ&sig2=V5IS8juEMVHB18Mv2Xx_Ww; consultada por última vez el 5/11/2012).

- 55 En algunos aspectos, el marcador en la sonda es un fluoróforo. En algunos aspectos, el fluoróforo en la sonda es naranja. En algunos aspectos, el fluoróforo en la sonda es verde. En algunos aspectos, el fluoróforo en la sonda es rojo. En algunos casos, el fluoróforo en la sonda es amarillo. En algunos aspectos, una sonda se marca con un fluoróforo rojo, y una con un fluoróforo verde. En algunos aspectos, una sonda se marca con un fluoróforo verde y una con un fluoróforo naranja. En algunos casos, el fluoróforo en la sonda es amarillo. Por ejemplo, si la sonda específica de MAF se marca con un fluoróforo rojo, y la sonda específica de IGH se marca con un fluoróforo verde,

si se ve blanco indica que las señales se superponen y se ha producido la translocación.

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

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

En un aspecto particular, un método dado a conocer para el pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis ósea en un sujeto con cáncer de próstata comprende determinar el número de copias del gen c-MAF en una muestra de dicho sujeto, en el que el gen c-MAF está translocado y comparar dicho número de copias de una muestra de control o referencia, en el que si 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 mayor tendencia a desarrollar metástasis ósea.

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

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

Método de pronóstico del desenlace clínico en cáncer de próstata basado en detectar la amplificación o la translocación del gen c-MAF

En otro aspecto, se da a conocer un método *in vitro* (a continuación en el presente documento, séptimo método dado a conocer) para predecir el desenlace clínico de un paciente que padece cáncer de próstata, que comprende determinar si el gen c-MAF está amplificado o está translocado en una muestra de dicho sujeto en relación con un número de copias del gen de referencia en el que una amplificación del gen c-MAF con respecto a dicho número de copias del gen de referencia es indicativa de un mal desenlace clínico.

El séptimo método dado a conocer comprende, en una primera etapa, determinar si el gen c-MAF está amplificado en una muestra de un sujeto. La determinación de la amplificación del c-MAF se lleva a cabo esencialmente como se describe en el quinto método de la divulgación. En un aspecto preferido, la muestra es una muestra de tejido tumoral. En un aspecto preferido, la amplificación del gen c-MAF se determina por medio de la determinación de la amplificación del locus 16q23 ó 16q22-q24. En otro aspecto preferido, la amplificación del gen c-MAF se determina por medio de utilizar una sonda específica del gen c-MAF.

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

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

En otro aspecto, el número de copias del gen de referencia es el número de copias génicas en una muestra de cáncer de próstata, de un sujeto que no ha padecido metástasis ósea.

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

En otro aspecto y tal como se describe en la presente divulgación, dado que el chr16q22-24, que incluye el gen c-MAF, está amplificado en células de cáncer de próstata, se relaciona con la presencia de metástasis, la amplificación de chr16q22-24, que incluye el gen c-MAF, la amplificación permite tomar decisiones en cuanto a la terapia más adecuada para el sujeto que padece dicho cáncer.

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

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

en el que si la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en la muestra tumoral está aumentado con respecto a la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en la muestra de control, entonces dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia dirigida a prevenir y/o tratar la metástasis del cáncer o una terapia para prevenir o tratar la degradación ósea. En un aspecto particular de este método, se administra luego al sujeto al menos un fármaco terapéutico que previene, inhibe y/o trata la metástasis ósea,

en la que si el chr16q22-24, que incluye el gen c-MAF, no está amplificado con respecto al número de copias de dicha región genómica en la muestra de referencia, entonces dicho sujeto no es susceptible de recibir una terapia para prevenir la degradación ósea. En un aspecto particular de este método, no se administra luego al sujeto al menos un fármaco terapéutico que previene, inhibe y/o trata la metástasis ósea.

La divulgación se refiere a un fármaco terapéutico que previene, inhibe y/o trata la metástasis ósea de aquellos enumerados previamente.

Métodos terapéuticos de la divulgación

Tratamiento de la metástasis ósea utilizando agentes inhibidores de c-MAF

Puede usarse un agente inhibidor de la expresión del gen c-MAF o un agente inhibidor de la proteína codificada por dicho gen en el tratamiento y/o la prevención de metástasis del cáncer de próstata.

Por tanto, en otro aspecto, la divulgación se refiere al uso de un agente inhibidor de la expresión del gen c-MAF o un agente inhibidor de la proteína codificada por dicho gen (a continuación en el presente documento, agente inhibidor de la divulgación) en la preparación de un producto medicinal para tratar y/o prevenir la metástasis del cáncer de próstata. Alternativamente, la divulgación se refiere a un agente inhibidor de la expresión del gen c-MAF o un agente inhibidor de la proteína codificada por dicho gen para su uso en el tratamiento y/o la prevención de metástasis del cáncer de próstata. Alternativamente, la divulgación se refiere a un método para tratar la metástasis del cáncer de próstata en un sujeto que comprende administrar un inhibidor de c-MAF a dicho sujeto. Tal como se usa en el presente documento, un “agente inhibidor de c-MAF” se refiere a cualquier molécula que puede inhibir total o parcialmente la expresión del gen c-MAF, tanto impidiendo que se produzca el producto de expresión de dicho gen (que interrumpe la transcripción del gen c-MAF y/o que bloquea la traducción del ARNm procedente de la expresión del gen c-MAF) como inhibiendo directamente la actividad de la proteína c-MAF. Los inhibidores de la expresión del gen c-MAF pueden identificarse utilizando métodos basados en la capacidad del supuesto inhibidor para bloquear la capacidad de c-MAF para promover la proliferación celular *in vitro*, tal como se muestra en la solicitud de patente internacional WO2005/046731, basados en la capacidad del supuesto inhibidor para bloquear la capacidad 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 (elemento sensible a MARE o c-MAF) en células las cuales expresan c-MAF tal como se describe en el documento WO2008098351 o basados en la capacidad del supuesto inhibidor para bloquear la expresión de un gen indicador bajo el control del promotor IL-4 en respuesta a la estimulación con PMA/ionomicina en células que expresan NFATc2 y c-MAF, tal como se describen en el documento US2009048117A.

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

Oligonucleótidos antisentido

Un aspecto adicional de la divulgación 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 pueden unirse a la posible diana del fármaco por medio de la complementariedad de bases convencionales o, por ejemplo, en el caso de unión a ADN bicatenario a través de una interacción específica en el gran surco de la doble hélice. Generalmente, estos métodos se refieren a una gama de técnicas generalmente usadas en la técnica e incluyen cualquier método que se base en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

Un constructo antisentido de la presente divulgación puede administrarse, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN complementario a al menos una parte única del ARNm celular que codifica para c-MAF. Alternativamente, el constructo antisentido es una sonda de oligonucleótidos generada *ex vivo* que, cuando se introduce en la célula, produce la inhibición de la expresión génica que se hibrida con el ARNm y/o las secuencias del gen de un ácido nucleico diana. Tales sondas de oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados que son resistentes a nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y por tanto son estables *in vivo*. Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico para su uso como oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN de fosforamidado, fosfotionato y metilfosfonato (véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 5176996; 5264564; y 5256775). Además, las aproximaciones generales para construir oligómeros útiles en la terapia antisentido se han revisado, por ejemplo, en Van der Krol *et al.*, BioTechniques 6: 958-976, 1988; y Stein *et al.*, Cancer Res 48: 2659-2668, 1988.

Con 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. El oligonucleótido antisentido se unirá al ARNm transcrito y se evitará la traducción.

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

Preferiblemente, los estudios *in vitro* se realizan en primer lugar para cuantificar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido para inhibir la expresión génica. Preferiblemente estos estudios utilizan controles que distinguen entre la inhibición de genes antisentido y los efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También preferiblemente, estos estudios compararon los niveles de ARN o proteína diana con los de un control interno de ARN o proteína. Los resultados obtenidos utilizando los oligonucleótidos antisentido puede compararse con aquellos obtenidos utilizando un oligonucleótido de control. Preferiblemente, el oligonucleótido de control es aproximadamente de la misma longitud que el oligonucleótido que va a someterse a ensayo y que la secuencia de oligonucleótidos no difiere de la secuencia antisentido más de lo que se considera necesario para evitar la hibridación específica con la secuencia diana.

El oligonucleótido antisentido puede ser un ADN o ARN mono o bicatenario o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de los mismos. El oligonucleótido puede modificarse en el grupo base, el grupo azúcar o el esqueleto fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a los receptores de las células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652, 1987; publicación PCT n.º WO 88/09810) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, publicación PCT n.º WO 89/10134), agentes de intercalación (véase, por ejemplo, Zon, Pharm. Res. 5: 539-549, 1988). Para este fin, el oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de transporte, un agente de escisión que desencadena la 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 se limita a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa. El oligonucleótido antisentido también puede contener un esqueleto similar a un péptido neutro. Tales moléculas se conocen como oligómeros de ácido nucleico peptídico (PNA) y se describen, por ejemplo, en Perry-O'Keefe *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 14670, 1996, y en Eglom *et al.*, Nature 365: 566, 1993.

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

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

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

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

ARNip

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

20 Los ARNip de la divulgación son sustancialmente homólogos a los ARNm del gen que codifica para c-MAF o a la secuencia del gen que codifica para dicha proteína. "Sustancialmente homólogo" se entiende como que tiene una secuencia que es suficientemente complementaria o similar al ARNm diana tal que el ARNip pueda degradar este último a través de la interferencia del ARN. El ARNip adecuado para provocar dicha interferencia incluye ARNip formado por ARN, así como ARNip que contiene diferentes modificaciones químicas tales como:

25 - ARNip en el que los enlaces entre los nucleótidos son diferentes de aquellos que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces fosforotionato.

- Conjugados de la cadena de ARN con un reactivo funcional, tales como un fluoróforo.

- Modificaciones de los extremos de las cadenas de ARN, particularmente del extremo 3' mediante la modificación con diferentes grupos funcionales hidroxilo en la posición 2'.

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

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

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

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

45 - Alternativamente, es posible el uso de vectores en los que cada una de las cadenas que forman el ARNip se forme a partir de la transcripción de una unidad de transcripción diferente. Estos vectores se dividen a su vez en vectores de transcripción divergentes y convergentes. En vectores de transcripción divergentes, las unidades de transcripción que codifican para cada una de las cadenas de ADN que forman el ARNip está ubicadas en tándem en un vector tal que la transcripción de cada cadena de ADN depende de su propio promotor el cual puede ser el mismo o diferente (Wang, J. *et al.*, 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100:5103-5106 y Lee, N.S., *et al.*, 2002, *Nat. Biotechnol.*, 20:500-505). En vectores de transcripción convergentes, las regiones de ADN que dan lugar al ARNip forman las cadenas sentido y antisentido de una región de ADN que está flanqueada por dos promotores inversos.

50 Después de la transcripción de las cadenas sentido y antisentido de ARN, este último formará el híbrido para formar un ARNip funcional. Se han descrito vectores con sistemas de promotor inverso en los que se utilizan 2 promotores U6 (Tran, N. *et al.*, 2003, *BMC Biotechnol.*, 3:21), un promotor U6 de ratón y un promotor H1 de humano (Zheng, L., *et al.*, 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 135-140 y documento WO 2005026322) y un promotor U6 de humano y un promotor H1 de ratón (Kaykas, A. y Moon, R., 2004, *BMC Cell Biol.*, 5:16).

- Los promotores adecuados para su uso en la expresión de ARNip a partir de vectores de expresión convergentes o divergentes incluyen cualquier promotor o par de promotores compatibles con las células en las que se va a expresar el ARNip. Por tanto, los promotores adecuados para la presente divulgación incluyen, pero no se limitan necesariamente a, promotores constitutivos tales como aquellos derivados de los genomas de virus eucarióticos tales como el virus del poliovirus, adenovirus, VS40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, promotor del gen de metalotioneína, el promotor del gen de timidina cinasa del virus del herpes simple, las regiones LTR del retrovirus, el promotor del gen de inmunoglobulina, el promotor del gen de actina, el promotor del gen de EF-1alfa así como promotores inducibles en los que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o una señal exógena tal como el sistema tetraciclina, el sistema de luz NFkappaB/UV, el sistema Cre/Lox y el promotor del gen de choque térmico, los promotores de la ARN polimerasa II regulables descritos en el WO/2006/135436 así como promotores tisulares específicos (por ejemplo, el promotor PSA descrito en el documento WO2006012221). En un aspecto preferido, los promotores son promotores de la ARN polimerasa III los cuales actúan constitutivamente. Los promotores de la ARN polimerasa III se encuentran en un limitado número 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, sino que necesitan secuencias en la dirección 5' que comprende una caja TATA en las posiciones -34 y -24, un elemento de secuencia próximo o PSE entre -66 y -47 y, en algunos casos, un elemento de secuencia distal o DSE entre las posiciones -265 y -149. En un aspecto preferido, los promotores de la ARN polimerasa III de tipo III son los promotores de los genes H1 y U6 humanos o murinos. En otro aspecto más preferido, los promotores son 2 promotores U6 humanos o murinos, un promotor U6 de ratón y un promotor H1 de humano o un promotor U6 de humano y un promotor H1 de ratón.

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

- Los vectores adecuados para expresar ARNip y ARNhc incluyen vectores de expresión procarióticos tales como pUC18, pUC19, Bluescript y los derivados de los mismos, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, fagos y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28, vectores de expresión de levadura tales como vectores tipo plásmido de 2 micrómetros, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión de células de insecto tales como vectores de serie pAC y vectores de serie pVL, vectores de expresión de plantas tales como vectores de serie pBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión de células eucariotas superiores basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados con adenovirus así como retrovirus y particularmente lentivirus) o vectores no virales tales como pDNAC3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEFI/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL y pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1. En un aspecto preferido, los vectores son vectores lentivirales.

- El ARNip y ARNhc de la divulgación pueden obtenerse utilizando una serie de técnicas conocidas por el experto en la técnica. La región de la secuencia de nucleótidos tomada como base para diseñar el ARNip no es limitante y puede contener una región de la secuencia de codificación (entre el codón de inicio y el codón final) o puede contener alternativamente secuencias de las regiones 5' ó 3' no traducidas, preferiblemente entre 25 y 50 nucleótidos de longitud y en cualquier posición en la dirección de 3' con respecto a la del codón de inicio. Una manera de diseñar un ARNip implica la identificación de los motivos AA(N19)TT en los que N puede ser cualquier nucleótido en la secuencia del gen c-MAF, y la selección de aquellos que tienen un alto contenido de G/C. Si no se encuentra dicho motivo, es posible identificar el motivo NA(N21) en el que N puede ser cualquier nucleótido.

Los ARNip específicos de c-MAF incluyen los ARNip descritos en el documento WO2005046731, una de las cadenas de los cuales es ACGGCUCGAGCAGCGACAA (SEQ ID NO 6). Otras secuencias de ARNip específicas de c-MAF incluyen, pero no se limitan a, CUUACCAGUGUGUUCACAA (SEQ ID NO 7), UGGAAGACUACUACUGGAUG (SEQ ID NO 8), AUUUGCAGUCAUGGAGAACC (SEQ ID NO 9), CAAGGAGAAAUACGAGAAGU (SEQ ID NO 10), ACAAGGAGAAAUACGAGAAG (SEQ ID NO 11) y ACCUGGAAGACUACUACUGG (SEQ ID NO 12).

Enzimas de ADN

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

Ribozimas

También pueden utilizarse moléculas de ribozima diseñadas para escindir catalíticamente los 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 de ARN enzimáticas que pueden catalizar la escisión específica de ARN (para una revisión, véase, Rossi, *Current Biology* 4: 469-471, 1994). El mecanismo de acción de la ribozima implica una hibridación específica de una secuencia de moléculas de ribozima a un ARN complementario diana seguido de un acontecimiento de escisión endonucleolítica. La composición de las moléculas de ribozima preferiblemente incluye una o más secuencias complementarias al ARNm diana y la bien conocida secuencia responsable de escindir el ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.093.246).

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

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

Anticuerpos inhibidores

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

Péptidos inhibidores

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

Dominantes negativos de c-MAF

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

Alternativamente, los dominantes negativos de c-MAF incluyen variantes de c-MAF que mantienen la capacidad para dimerizar con otras proteínas pero carecen de la capacidad para 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. Por tanto, las variantes de los dominantes negativos de c-MAF incluyen de manera ilustrativa las variantes en las que se han eliminado al menos los aminoácidos 1 a 122, al menos los aminoácidos 1 a 187 o al menos los aminoácidos 1 a 257 (considerando la numeración de c-MAF humano, tal como se describe en el documento US 6.274.338).

La divulgación contempla el uso tanto de las variantes de los dominantes negativos de c-MAF como de 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 utilizarse para regular la transcripción del polinucleótido de la divulgación pueden ser promotores constitutivos, es decir, promotores que dirigen la transcripción a nivel basal, o promotores inducibles en los que la actividad transcripcional requiere una señal externa. Los promotores constitutivos adecuados para regular la transcripción son, entre otros, el promotor CMV, el promotor VS40, el promotor DHFR, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor del factor de elongación 1a (EFla), el promotor de albúmina, el promotor ApoA1, el promotor de queratina, el promotor CD3, el promotor de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada, el promotor de neurofilamento, el promotor de enolasa específico de neuronas, el promotor L7, el promotor CD2, el promotor de cinasa de cadena ligera de la miosina, el promotor del gen HOX, el promotor de

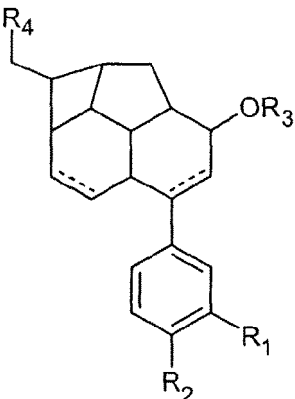
timidina cinasa, el promotor de la ARN polimerasa II, el promotor del gen MyoD, el promotor del gen de la fosfogliceratecina (PGK), el promotor de la lipoproteína de baja densidad (LDL), el promotor del gen de la actina. En un aspecto preferido, el promotor que regula la expresión del transactivador es el promotor del gen PGK. En un aspecto preferido, el promotor que regula la transcripción del polinucleótido de la divulgación es el promotor de la ARN polimerasa del gen T7.

Preferiblemente, los promotores inducibles que pueden usarse en el contexto de la presente divulgación son aquellos que responden a un agente inductor que muestra una expresión basal nula o despreciable en ausencia de un agente inductor y pueden promover la activación del gen localizado en la posición 3'. Dependiendo del tipo de agente inductor, los promotores inducibles se clasifican como promotores de 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 de Pip on/off (documento US 6287813); promotores dependientes de antiprogesterina (documento US 2004132086), promotores dependientes de ecdisona (Christopherson *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6314-6318; No *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351, Suhr *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:7999-8004 y documento WO9738117), un promotor dependiente de metalotioneína (documento WO8604920) y promotores dependientes de rapamicina (Rivera *et al.*, 1996, Nat. Med. 2:1028-32).

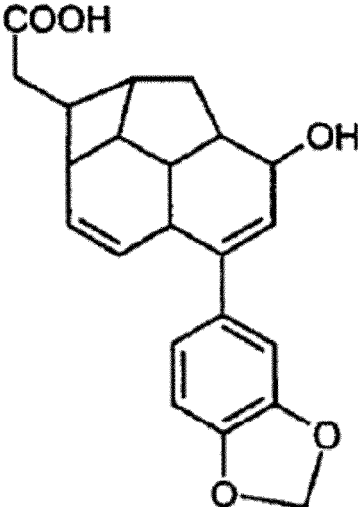
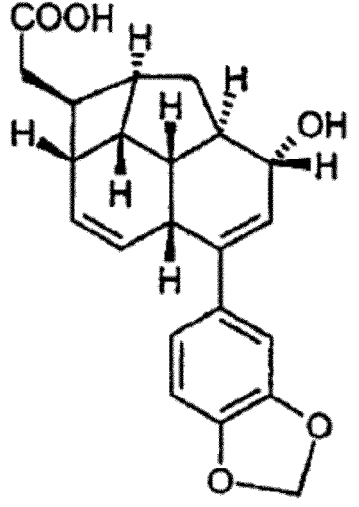
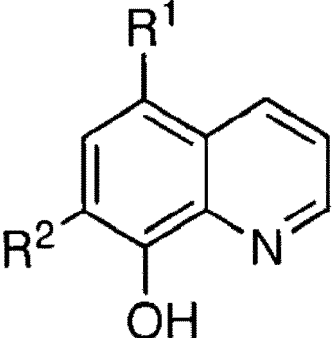
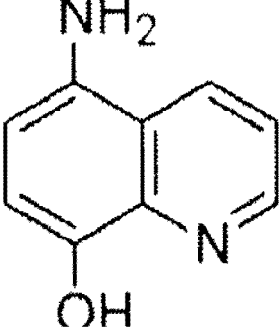
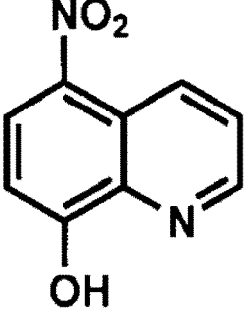
Los vectores adecuados para expresar el polinucleótido que codifica para la variante de los dominantes negativos de c-MAF incluye vectores derivados de vectores de expresión procarióticos tales como pUC18, pUC19, Bluescript y derivados de los mismos, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColEI, pCR1, RP4, fagos y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28, vectores de expresión de levadura tales como vectores tipo plásmido de 2 micrómetros, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión de células de insecto tales como vectores de serie pAC y vectores de serie pVL, vectores de expresión de plantas tales como vectores de serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares, y vectores de expresión de células eucariotas superiores basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados con adenovirus así como retrovirus y particularmente lentivirus) o vectores no virales tales como pADNc3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL y pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1.

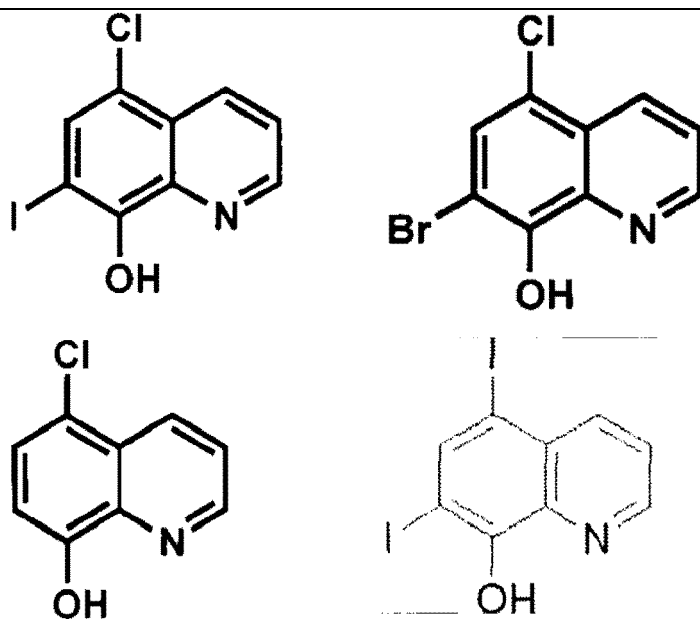
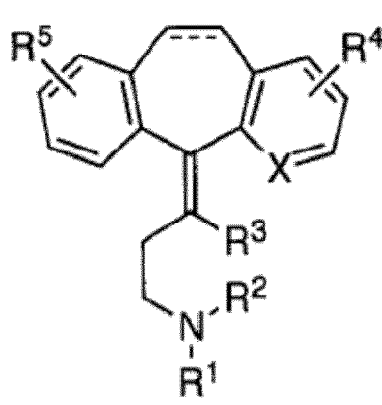
Otros compuestos inhibidores de la actividad de la proteína c-MAF

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

I	<p>Derivados H del ácido endiátrico tales como aquellos descritos en el documento WO2004014888 que corresponden a la fórmula general</p>  <p>donde</p> <p>R₁ y R₂ son, independientemente del otro,</p> <p>1.0 H o</p> <p>2.0 un grupo O-C₁-C₆-alquilo, -O-C₂-C₆-alquenilo, -O-C₂-C₆-alquinilo o -O-C₆-C₁₀-arilo, en el que el alquilo, alquenilo y alquinilo son de cadena lineal o ramificada, y en el que los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo están mono o disustituidos con:</p> <p>2.1 -OH,</p> <p>2.2 =O,</p> <p>2.3 -O-C₁-C₆-alquilo, en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada,</p>
---	--

<p>2.4 -O-C₂-C₆-alquenilo, en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada,</p> <p>2.5 -O-C₆-C₁₀-arilo,</p> <p>2.6 -NH-C₁-C₆-alquilo, en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada,</p> <p>2.7 -NH-C₂-C₆-alquenilo, en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada,</p> <p>2.8 -NH₂ o</p> <p>2.9 halógeno,</p> <p>y en el que el grupo arilo, está opcionalmente mono o disustituido con el sustituyente 2.1 ó 2.3 a 2.9, en el que los sustituyentes 2.3, 2.4, 2.6 y 2.7 pueden estar además sustituidos con funciones -CN, -amida u -oxima, y 2.5 puede estar además sustituido con funciones -CN o amida, o R₁ y R₂ juntos forman un anillo, en el que R₁ y R₂ significa un grupo -O-[(C₁-C₆)-alquileo]-O-,</p> <p>R₃ es</p> <p>1.0 H o</p> <p>2.0 un grupo -O-C₁-C₆-alquilo, -O-C₂-C₆-alquenilo, -O-C₂-C₆-alquinilo o -O-C₆-C₁₀-arilo, en el que el alquilo, alquenilo y alquinilo son de cadena lineal o ramificada, y en el que los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo están mono o disustituidos con:</p> <p>2.1 -OH,</p> <p>2.2 =O,</p> <p>2.3 -O-C₁-C₆-alquilo, en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada,</p> <p>2.4 -O-C₂-C₆-alquenilo, en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada,</p> <p>2.5 -C₆-C₁₀-arilo,</p> <p>2.6 -NH-C₁-C₆-alquilo, en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificada,</p> <p>2.7 -NH-C₂-C₆-alquenilo, en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificada,</p> <p>2.8 -NH₂ o</p> <p>2.9 halógeno,</p> <p>y en el que el grupo arilo, está opcionalmente mono o disustituido con el sustituyente 2.1 ó 2.3 a 2.9, en el que los sustituyentes 2.3, 2.4, 2.6 y 2.7 pueden estar además sustituidos con funciones -CN, -amida u -oxima, y 2.5 pueden estar además sustituidos con funciones -CN o amida</p> <p>R₄ es CO₂R₃, CO₂NHR₃, CHO, CH₂OR₃, CH₂OSi(R₃)₃, CH₂Br, CH₂CN,</p> <p>en el que R₃ es como se define anteriormente,</p> <p>y, en particular, los compuestos</p>
--

	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div>
<p>II</p>	<p>Derivados de 8-hidroxiquinolina tales como aquellos descritos en el documento WO2009146546 de fórmula general</p> <div style="text-align: center; margin: 20px 0;">  </div> <p>donde</p> <p>R¹ se selecciona del grupo que consiste en NO₂, NH₂, NH(C₁-C₆-alquilo) y N (C₁-C₆-alquilo) (C₁-C₆-alquilo);</p> <p>R² se selecciona de H, halógeno, C₁-C₆ alquilo, y C₁-C₆ alquilo fluoro-sustituido,</p> <p>O</p> <p>R¹ es Cl y R² es Br o H,</p> <p>y, preferiblemente, los compuestos</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div>

	
III	Clioquinol (5-cloro-7-yodoquinolin-8-ol) como se describe en el documento WO09049410
IV	<p>Compuestos tales como aquellos descritos en el documento WO08098351 de fórmula general</p>  <p>donde</p> <p>==-:-: es un enlace sencillo o doble,</p> <p>R¹ se selecciona del grupo que consiste en H, C₁-C₄ alquilo, C(O)O C₁-C₄ alquilo, C(O) C₁-C₄ alquilo y C(O) NH C₁-C₄ alquilo;</p> <p>R² se selecciona de H y C₁-C₄ alquilo;</p> <p>R³ se selecciona de H y C₁-C₄ alquilo; o R² y R³ están unidos entre sí juntos con los átomos de carbono y nitrógeno a los que están unidos para formar un anillo de piperidina,</p> <p>R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de H, halógeno, hidroxilo, C₁-C₄ alquilo, C₁-C₄ alquilo fluoro-sustituido y C₁-C₄ alcoxilo; y</p> <p>X se selecciona de C y N,</p> <p>y compuestos preferidos tales como</p> <p>Ciproheptadina (clorhidrato de 4-(5H-dibenzo-[a,d]ciclohepten-5-iliden)-1-metilpiperidina),</p> <p>Amitriptilina (3-(10,11-dihidro-5H-dibenzo[[a,d]ciclohepten-5-iliden)-N,N-dimetil-1-propanamina),</p> <p>Loratadina (4-(8-cloro-5,6-dihidro-11H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridin-11-iliden)-1-</p>

	piperidincarboxilato de etilo), Ciclobenzaprina (3-(5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5-iliden)-N,N-dimetil-1-propanamina).
V	Nivalenol (12,13-epoxi-3,4,7,15-tetrahidroxitricotec-9-en-8-ona) como se describe en el documento WO0359249

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

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

Antagonista	Referencia para la actividad inhibidora de cdk2
Análogos de purina	
Purvalanoles tales como 2-(1R-isopropil-2-hidroxietilamino)-6-(3-cloronilino)-9-isopropilpurina que tienen una fórmula molecular $C_{19}H_{25}ClN_6O$ disponibles 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 reemplaza 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 $C_{15}H_{18}N_6O$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial Olomoucine (#O0886), 2-(2'-Hidroxietilamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina que tiene una fórmula molecular $C_{17}H_{22}N_6O$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial N9-isopropilolomoucine (#I0763); CVT-313	Vesely, J., <i>et al.</i> , (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86, 11; Brooks, E.E., <i>et al.</i> , (1997) J. Biol. Chem., 272, 29207-11.
6-(Bencilamino)-2(R)-[[1-(hidroximetil)propil]amino]-9-isopropilpurina 2-(R)-[[9-(1-metiletil)-6-[(fenilmetil)amino]-9H-purin-2-il]amino]-1-butanol que tiene una fórmula molecular $C_{19}H_{26}N_6O$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial Roscovitine (#R7772), metoxiroscovitine	Wang, D. <i>et al.</i> , J. Virol., 75, 7266-7279 (2001); McClue, S.J. <i>et al.</i> , Int. J. Cancer, 102, 463-468 (2002); Meijer, L., <i>et al.</i> , (1997) Eur. J. Biochem., 243, 527-36
Análogo de purina N2-(cis-2-aminociclohexil)-N6-(3-clorofenil)-9-etil-9H-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 (arriba) donde el Cl se reemplaza con CN, OH se elimina, 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 tiene una fórmula molecular $C_{16}H_{11}N_3O_2$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial (#I0404), indirubina 5-sulfonato, 5-cloro indirubina	Davies, T.G. <i>et al.</i> , Structure, 9,389-397 (2001); Marko, D. <i>et al.</i> , Br. J. Cancer, 84, 283-289 (2001); Hoessel, R., <i>et al.</i> , (1999) Nat. Cell Biol., 1, 60-7; PCT/US02/30059 a Hellberg <i>et al.</i> , publicada como WO 03/027275.
Oxindol 1 de Fischer como se referencia en la columna 2 de este 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); Metthey <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-iliden)metil]amino]-N-(2-piridil)bencenosulfonamida que tiene una fórmula molecular $C_{21}H_{15}N_5O_3S_2$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial GW8510 (#G7791)	Davis, S.T. <i>et al.</i> , Science, 291, 134-137 (2001); PCT/US02/30059 a Hellberg <i>et al.</i> , publicada como WO 03/027275.
Flavopiridoles tales como flavopiridol (L86 8275; NCS 649890, Instituto Nacional del Cáncer, Betesda, MD) y un derivado decloro	Carlson, B.A., <i>et al.</i> , (1996) Cancer Res., 56, 2973-8
Alcaloides tales como Staurosporine (#S1016, A.G. Scientific, San Diego, CA) o UCN-01 (7-hidroxistaurosporina) Instituto Nacional del Cáncer, Betesda, 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
Paullonas tales como 9-bromo-7,12-dihidro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-ona que tiene una fórmula molecular $C_{16}H_{11}BrN_2O$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial kenpaullone (#K3888), o 9-nitro-7,12-dihidroindolo-[3,2-d][1]benzazepin-6(5)-ona que tiene una fórmula molecular $C_{16}H_{11}N_3O_3$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial 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; PCT/US02/30059 a Hellberg <i>et al.</i> , publicada como

	WO 03/027275.
CGP 41251, un alcaloide	Begemann, M., <i>et al.</i> , (1998) Anticancer Res., 18, 2275-82; Fabbro <i>et al.</i> , Pharmacol Ther. 1999 mayo-junio;82(2-3): 293-301
Himenialdisinas tales como 10z-himenialdisina que tiene una fórmula molecular $C_{11}H_{10}BrN_5O_2$ 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; PCT/US02/30059 a Hellberg <i>et al.</i> , publicada como WO 03/027275.
CGP60474, una fenilaminopirimidina	21; WO95/09853, Zimmermann <i>et al.</i> , 21 de septiembre, 1994
Tiazolopirimidina 2	Attaby <i>et al.</i> , Z. Naturforsch. 54b, 788-798 (1999)
Diarilurea	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 $C_{24}H_{24}O_7$ disponible de Sigma-Aldrich con el nombre comercial Butyrolactone-I (B7930)	Kitagawa, M. <i>et al.</i> , Oncogene, 8, 2425-2432 (1993).
Aloisina A, n.º de cat. 128125 (Calbiochem, San Diego, CA)	Mettey <i>et al.</i> , J. Med. Chem. 2003, 46, 222-236

Tabla 2: Inhibidores de c-MAF

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

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

El término "portador" se refiere a un diluyente o un excipiente por el cual se administra el principio activo. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceite, incluyendo aquellos de un origen petrolífero, animal, vegetal o sintético tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua o las disoluciones salinas acuosas y las disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para disoluciones inyectables, se utilizan preferiblemente como portadores. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin, 1995. Preferiblemente, los portadores de la divulgación están aprobados por la agencia reguladora del gobierno estatal o federal o están listados en la farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y más particularmente en seres humanos.

Los portadores y las sustancias auxiliares necesarias para fabricar la forma de dosificación farmacéutica deseada de la composición farmacéutica de la divulgación dependerán, entre otros factores, de la forma de dosificación farmacéutica elegida. Dichas formas de dosificación farmacéutica de la composición farmacéutica se fabricarán según los métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica. Una revisión de los diferentes métodos para administrar principios activos, excipientes que van a utilizarse y procesos para producirlos pueden encontrarse en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. Edición 1993. Los ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (comprimidos, pastillas, cápsulas, gránulos, etc.) o composición líquida (disoluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. Además, la composición farmacéutica puede contener, cuando se considere necesario, estabilizadores, suspensiones, conservantes, surfactantes y similares.

Para el uso en medicina, los agentes inhibidores de c-MAF pueden encontrarse en forma de un profármaco, una sal, un solvato o un clatrato, o bien aislado o bien en combinación con agentes activos adicionales y puede formularse junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes preferidos para su uso en el presente documento incluyen azúcares, almidones, celulosas, cauchos y proteínas. En un aspecto particular, la composición

farmacéutica de la divulgación se formulará en una forma de dosificación farmacéutica sólida (por ejemplo comprimidos, cápsulas, pastillas, gránulos, supositorios, cristal estéril o sólidos amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas, etc.), forma de dosificación farmacéutica líquida (por ejemplo disoluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos, etc.) o forma de dosificación farmacéutica semisólida (geles, ungüentos, cremas y similares). Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden administrarse por cualquier vía, que incluyen, pero no se limitan a, la vía oral, vía intravenosa, vía intramuscular, vía intraarterial, vía intramedular, vía intratecal, vía intraventricular, vía transdérmica, vía subcutánea, vía intraperitoneal, vía intranasal, vía entérica, vía tópica, vía sublingual o vía rectal. Una revisión de las diferentes formas para administrar principios activos, de los excipientes que van a utilizarse y de los procesos de fabricación de los mismos puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A., Edición 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), edición n.º 20, Williams & Wilkins PA, EE.UU. (2000). Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables se conocen en el estado de la técnica e incluyen disoluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos portadores pueden formularse mediante procesos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

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

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

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

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

Los pacientes que padecen cáncer de próstata que ha metastatizado en el hueso y en el que hay niveles elevados de c-MAF en dicha metástasis pueden beneficiarse particularmente de terapias dirigidas a prevenir la degradación ósea provocada por el aumento de la actividad osteoclástica.

En un aspecto, la invención se refiere a un agente para evitar o prevenir la degradación ósea para su uso en el tratamiento de la metástasis ósea en un sujeto que se ha identificado que tiene una amplificación del gen c-MAF o un número de copias aumentado en comparación con un valor de referencia, en el que el agente que puede prevenir o inhibir la degradación ósea se selecciona del grupo que consiste en: un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, un inhibidor de PTH o PTHLH (incluyendo anticuerpos y péptidos neutralizantes), un análogo de PRG, ranelato de

estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor dual de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógenos, un inhibidor de EGFR, calcitonina, radio-223 y un inhibidor de cathepsina K.

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

- 5 Los términos y expresiones “sujeto”, “cáncer de próstata”, “muestra tumoral”, “metástasis”, “gen c-MAF”, “niveles de expresión aumentados o elevados” y “muestra de control” se han descrito en detalle en relación con el primer método de la divulgación y son igualmente aplicables al agente para evitar o prevenir la degradación ósea.

Los agentes que pueden 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 personalizado.

- 10 La referencia o muestra de control es una muestra tumoral de un sujeto con cáncer de próstata que no ha padecido metástasis o que corresponde a la mediana del valor de los niveles de expresión del gen c-MAF medidos en una colección de tejido tumoral en muestras de biopsia de sujetos con cáncer de próstata que no han padecido metástasis.

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

Alternativamente, puede llevarse a cabo un tratamiento combinado, en el que se combinan más de un agente para evitar o prevenir la degradación ósea 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 una hormona.

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

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

Kits de la divulgación

- 25 En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para predecir metástasis ósea de un cáncer de próstata, 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 de expresión cuantificado de c-MAF en dicha muestra con un nivel de expresión de c-MAF de referencia.

- 30 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un kit para predecir el desenlace clínico de un sujeto que padece metástasis ósea de un cáncer de próstata, 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 expresión de c-MAF de referencia.

- 35 En otro aspecto la divulgación se refiere a un kit para determinar una terapia para un sujeto que padece cáncer de próstata, 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 el nivel de expresión de c-MAF de referencia; y c) medios para determinar una terapia para prevenir y/o reducir la metástasis ósea en dicho sujeto basándose en la comparación del nivel de expresión cuantificado con el nivel de expresión de referencia; d) medios para excluir una terapia para prevenir y/o reducir la metástasis ósea en dicho sujeto basándose en la comparación del nivel de expresión cuantificado con el nivel de expresión de referencia.

- 40 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 próstata, y ii) uno o más índices de nivel de expresión del gen c-MAF que se han predeterminado para correlacionar con el riesgo de metástasis ósea.

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

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

En un aspecto particular, el cáncer de próstata es adenoma de próstata o carcinoma de las células pequeñas de la próstata.

- 50 En un aspecto particular, el kit se aplica, pero no se limita a, una biopsia de cáncer de próstata, una célula de cáncer de próstata circulante, un ADN de tumor de próstata circulante.

Todos los aspectos particulares de los métodos de la presente divulgación son aplicables a los kits de la invención y

a sus usos.

Método para tipificar una muestra de un sujeto que padece cáncer de próstata.

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

5 en una muestra de tejido tumoral obtenida de dicho sujeto:

a) cuantificar la amplificación o el número de copias de c-MAF en dicha muestra;

c) tipificar dicha muestra comparando la amplificación o el número de copias de c-MAF con una amplificación o un número de copias de c-MAF de referencia predeterminado;

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

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

En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral, una célula de tumor circulante o un ADN de tumor circulante.

15 Método para clasificar un sujeto que padece cáncer de próstata.

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

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

En una realización particular, el cáncer de próstata es un adenoma o un carcinoma de las células pequeñas.

25 En una realización preferida, la muestra es una muestra de tejido tumoral, una célula de tumor circulante o un ADN circulante.

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

30 En otra realización preferida, dicho nivel de expresión de c-MAF en dicha muestra está aumentado en relación con dicho nivel de referencia predeterminado, y en el que los miembros de la cohorte se clasifican como que tienen un riesgo mayor de metástasis ósea.

En otra realización preferida, dicha cohorte es para realizar un ensayo clínico.

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

Ejemplos

Relevancia clínica y valor pronóstico del gen de metástasis específico del hueso

35 Se sometió a prueba c-MAF en una micromatriz de tejido (TMA) que incluye 37 biopsias de tumor de próstata para las cuales se conocían las anotaciones clínicas del tiempo hasta la metástasis ósea o metástasis visceral. Estos tumores son representativos de todos los subtipos y estadios del cáncer de próstata. Los niveles de c-MAF se determinaron mediante inmunohistoquímica (IHC) utilizando un anticuerpo específico para c-MAF y se estableció la asociación entre los niveles de expresión de c-MAF y el riesgo de recaída ósea por medio de los cálculos de razón de probabilidad (OR). La OR es una medición del tamaño del efecto, que describe la fuerza de asociación o la no independencia entre dos datos binarios. La OR se describe en Glas, A.S. "The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance" (2003) J. of Clinical Epidemiology 56: 1129-1135. La razón de probabilidad describe la fuerza de asociación o la no independencia entre dos valores de datos binarios (gen de interés positivo o negativo, metástasis ósea positiva o negativa). En algunas realizaciones, la razón de probabilidad es al menos aproximadamente 1, 1,2, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, ó 5. Estas muestras en la TMA son tejidos tumorales primarios embebidos en parafina de tumores de próstata. Estas muestras se recogieron en el Instituto de Oncología Vall d'Hebron y en el Hospital Vall d'Hebron durante la práctica clínica normal junto con los datos clínicos relevantes necesarios y la aprobación del comité clínico.

Las muestras que se seleccionaron cumplían los siguientes criterios:

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

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

- 5 Los 3 tumores restantes provienen de pacientes M0 en el momento del diagnóstico que tuvieron una recaída en cualquier lugar distinto al hueso.

Ejemplo 1: La expresión de c-MAF está asociada con el riesgo de metástasis, en particular metástasis ósea.

Análisis inmunohistoquímico

- 10 La inmunotinción de c-MAF se realizó en TMA. Esta TMA se construyó en portaobjetos de vidrio y se realizó IHC utilizando la plataforma Dako Link de acuerdo con el procedimiento operativo.

- 15 Brevemente, la inmunotinción se realizó en secciones del tejido tumoral de 3 µm situadas en portaobjetos de vidrio cargados positivamente (Superfrost o similar) en una plataforma Dako Link. Después de la desparafinación, se realizó la recuperación de antígenos por calor a pH 6,1, en disolución tamponada basada en citrato 0,01 mol/l (Dako). La peroxidasa endógena se extinguió. Se utilizó una dilución 1:100 de anticuerpo policlonal de ratón anti-c-MAF (Santa Cruz) durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguida por incubación con un polímero de dextrano Ig anti-conejo acoplado con peroxidasa (Flex+, Dako). Luego, se visualizaron las secciones con 3,3'-diaminobencidina (DAB) y se contrastaron con hematoxilina.

- 20 La inmunotinción de c-MAF se puntuó mediante un algoritmo computarizado. Se adquirieron nueve imágenes representativas de cada muestra a intervalos de longitud de onda de 10 nm entre 420 y 700 nm, utilizando un microscopio Leica DM2000 equipado con el sistema de imágenes multiespectrales Nuance FX (CRI Inc). Las señales positivas se convirtieron de unidades de transmisión a unidades de densidad óptica tomando el logaritmo negativo de la razón de la muestra dividido entre la raíz cúbica de referencia utilizando la conversión de la ley de Beer. Se estableció un umbral asistido por ordenador, el cual creó una imagen a pseudo-color que resaltaba todas las señales positivas. Los análisis previos apoyaron la medición cuantitativa de la expresión de c-MAF.

- 25 Solo los núcleos de las células epiteliales (normales y malignas), pero no células del estroma o linfocitos, se detectaron automáticamente al establecer un umbral de tamaño distinto y lo confirmó un patólogo. Para cada caso se calculó el valor promedio de la intensidad de la señal de todas las regiones de interés para el análisis estadístico.

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

- 30 Se evaluó el valor pronóstico y predictivo de expresión de c-MAF para metástasis de cáncer de próstata. Los niveles de proteína c-MAF se determinaron mediante inmunohistoquímica (IHC). La inmunotinción de MAF se puntuó mediante una medición computarizada. La salida de la medición computarizada produjo datos continuos que oscilan entre 1160 y 99760 unidades de densidad óptica (D.O.) para la expresión de c-MAF. El punto de corte (10000 D.O.) para alta y baja expresión se determinó basándose en una curva operativa de recepción según los procedimientos convencionales.

- 35 Los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Niveles de expresión de la proteína c-MAF

Expresión de c-MAF	<u>Metástasis ósea</u>	
	NO	SÍ
<= 10.000 DO	21	2
> 10.000 DO	5	6

Basándose en estos valores, la razón de probabilidad de riesgo de padecer metástasis ósea en el grupo con alto c-MAF frente al bajo fue OR (metástasis ósea en cualquier momento) = 12,60 (I.C. del 95% 1,93-82,09).

- 40 Basándose en la segunda cohorte analizada, se extrajeron algunas características clínicas de diagnóstico. El alto nivel de c-MAF de expresión de la proteína predice metástasis ósea con una sensibilidad de 0,75, una especificidad de 0,81. Esto se resume y se expresa en porcentajes que incluyen los intervalos de confianza en la tabla 4.

Tabla 4

		I.C.	95%
Sensibilidad	75,0%	40,9%	92,9%
Especificidad	80,8%	62,1%	91,5%

La expresión del gen o proteína c-MAF en tumores de próstata identifica una población en riesgo de metástasis, en particular metástasis ósea en cualquier momento.

Ejemplo 2: La ganancia de la región cromosómica 16q22-24 (CNA, alteración del número de copias) se asocia con el riesgo de metástasis ósea.

Se sometió a prueba si una ganancia en chr16q22-q24, que incluía loci genómicos de c-MAF, está asociada con el riesgo de metástasis ósea en pacientes con cáncer de próstata. Para este fin, se utilizó un método que identifica amplificaciones de chr16q22-q24, en este caso por medio de una sonda de hibridación *in situ* de fluorescencia dual (FISH) chr16q23 y chr14q32 para medir el número de copias de la región chr16q22-24. También se utilizó la sonda chr14q32 para normalizar la poliploidía tumoral.

El análisis de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de 16q23, dentro de la amplificación de la región genómica 16q22-24, que incluye el gen c-MAF, se realizó en la TMA descrita anteriormente utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DM2000 según el procedimiento operativo. Se utilizó una mezcla de sonda SpectrumOrange que flanquea la región genómica del gen MAF y se compone de dos segmentos que tienen aproximadamente 350 kb con un espacio de aproximadamente 2,2 Mb. El segmento centromérico se encuentra en chr16:75729985-76079705 (ensamblaje de marzo de 2006, UCSC Genome Browser) y el segmento telomérico se encuentra en chr16:78290003-78635873 (ensamblaje de marzo de 2006, UCSC Genome Browser). Esta sonda flanquea cinco genes VAT1L, CLEC3A, WWOX, 5srRNA y MAF (ordenados desde el centrómero hasta el telómero).

Brevemente, la amplificación de la región 16q23, que incluye el gen MAF, y la región de control 14q32, que incluye el gen IgH, se determinaron mediante FISH en secciones de la TMA de 5 µm utilizando procedimientos convencionales. Las secciones de tejido desparafinadas se trataron con HCl 0,2 M, y luego con tiocianato de sodio para eliminar los precipitados de sal. Los portaobjetos pretratados se incubaron durante 10 min en una disolución de proteinasa K a 37°C. Los portaobjetos se fijaron posteriormente en formalina tamponada. Las sondas de ADN 16q23/14q32 marcadas con fluorescencia se desnaturalizaron a 78°C durante 5 min y se hibridaron durante la noche a 37°C en una placa calefactora. Se realizaron lavados durante 2 min a 72°C en una disolución de 2 x SSC/Nonidet P40 al 0,3%. Las secciones de tejido se contrastaron con 10 µl de 4,6-diamino-2-fenilindol (contratinción con DAPI).

Los resultados se capturaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM2000 y se analizaron con el sistema de imagen multiespectral Nuance FX. La puntuación FISH de señales de fluorescencia (rojo para la región 16q23 y verde para la región de control 14q32) se llevó a cabo contando el número de copias de cada región en un promedio de 50 núcleos no superpuestos para cada caso. Se evaluaron los valores pronóstico y predictivo de la asociación de ganancia de CNA 16q22-24 cromosómica con metástasis ósea en cáncer de próstata. Los números de región chr16q23 y chr14q32 de copias por núcleo se determinaron mediante FISH. El número esperado de cada señal de sonda fue dos por núcleo. Se consideró la amplificación cuando el promedio de las señales de la sonda 16q23 fue mayor que más de 1,5 cuando se normalizó por número de copias de la región 14q32.

Los resultados se resumen en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Razón chr16q23/chr14q32 y riesgo de metástasis

Un tumor será positivo para una ganancia de CNA 16q22-24 basándose en un punto corte \geq a 1,5 copias del 16q23 normalizado por el número de copias del 14q32.

Razón chr16q23/chr14q32	Metástasis	
	NO	SÍ
$\leq 1,5$	27	2
$> 1,5$	2	6

Tabla 6. Razón chr16q23/chr14q32 $\geq 1,5$ y predicción del riesgo de metástasis ósea

Un tumor será positivo para una ganancia de CNA chr16q22-24 basándose en un punto de corte \geq a 1,5 copias del chr16q23 normalizado por el número de copias del chr14q32.

Metástasis ósea

Razón chr16q23/chr14q32	NO	SÍ
$\leq 1,5$	31	2
$> 1,5$	1	3

Basándose en estos valores se calculó la razón de probabilidad de riesgo de padecer metástasis y metástasis ósea en la ganancia chr16q22-24 o en el grupo de ganancia positivo CNA frente al negativo. Basándose en esta estimación, la OR para los pacientes con CNA positivo chr16q22-24 para padecer una metástasis fue de 40,50 (I.C. del 95% 4,72-347,82), y la OR para la ganancia normalizada de CNA chr16q22-24 que utiliza pacientes positivos 14q32 frente al control y la metástasis ósea fue de 46,50 (I.C. del 95% 3,20-676,24). El pequeño tamaño de la cohorte hizo que las estimaciones fueran imprecisas pero dentro de una OR clínicamente relevante de al menos 4,72 y 3,20 con una confianza del 95% en cada caso.

Basándose en los datos analizados mediante FISH, se extrajeron algunas características clínicas de diagnóstico. La ganancia de CNA Chr16q22-24 ($\geq 1,5$ copias 16q23 por célula normalizada a chr14q32) predice riesgo de metástasis del cáncer de próstata con una sensibilidad de 0,75, una especificidad de 0,93. Estos resultados expresados en porcentajes se resumen a continuación en la tabla 7, que incluye intervalos de confianza del 95% (I.C.).

Tabla 7. Características clínicas de diagnóstico basadas en la ganancia de CNA Chr16q22-24 ($\geq 1,5$ copias 16q23 por célula normalizada a chr14q32) para la predicción del riesgo de cáncer de próstata de metástasis ósea.

	I.C.	95%
Sensibilidad 75,0%	40,9%	-92,9%
Especificidad 93,1%	78,0%	-98,1%

Basándose en los datos analizados mediante FISH, se extrajeron algunas características clínicas de diagnóstico. La ganancia de CNA Chr16q22-24 ($\geq 1,5$ copias 16q23 por célula normalizada a chr14q32) ice riesgo de metástasis del cáncer de próstata con una sensibilidad de 0,60, una especificidad de 0,97. Estos resultados expresados en porcentajes se resumen a continuación en la tabla 8, que incluye intervalos de confianza del 95% (I.C.).

Tabla 8. Características clínicas de diagnóstico basadas en la ganancia de CNA Chr16q22-24 ($\geq 1,5$ copias 16q23 por célula normalizada a chr14q32) para la predicción del riesgo de cáncer de próstata de metástasis ósea.

	I.C.	95%
Sensibilidad 60,0%	23,1%	-88,2%
Especificidad 96,9%	84,3%	-9,4%

La ganancia de CNA chr16q22-24, y en particular chr16q23, en tumores de próstata predice fuertemente y está asociada con el riesgo de metástasis y metástasis ósea en cualquier momento.

Lista de secuencias

<110> InBioMotion S.L.

GOMIS, Roger

JEAN-MAIRET, Joel

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

<130> 3190.003PC01/TJS/EJH

<140> Aún por asignar

<141> Con el presente documento

<150> Documento 61/713.318

<151> 12-10-2012

<160> 13

<170> Patentin versión 3.5

<210> 1

<211> 6878

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

agaggcttta aaatcttttt tcattcttcta gctgtagctc gggctgcttg tcggcttggc	60
ctccccctcc cccctttgct ctctgcctcg tctttcccca ggacttcgct attttgcttt	120
tttaaaaaaa ggcaagaaag aactaaactc cccctccct ctctccagt cgggctgcac	180
ctctgccttg cactttgcac agaggtagag agcgcgcgag ggagagagag gaaagaaaaa	240
aaataataaa gagagccaag cagaagagga ggcgagaagc atgaagtgtt aactccccg	300
tgccaaggcc cgcgccgccc ggacagacgc ccgcccgcgc tccagccccg agcggacgcc	360
gcgcgcgccc tgctgcagc ccggggccggc gagggcgagcc cttccttatg caaagcgcg	420
agcggagcgg cgagcggggg acgcccgcga ccggggccggg ctctccagc ttccgcccgc	480
cagccaccac cgccgccacc gcagctcgcg gaggatcttc ccgagcctga agccgcccgc	540
tcggcgcgca aggaggcgag cgagcaagga ggggcccggg cgagcgaggg agcacattgg	600
cgtgagcagg ggggagggag ggcgggcgcg gggggcgcg gcagggcggg ggggtgtgtg	660
tgtgagcgcg ctccggaggtt tcgggccagc caccgcccgc caagctagaa gcgccccagc	720
ccggcaagct ggctcaccgc ctggccacc agcacagccc gctggcccct ctctgcagc	780
ccatctggcg gagcggcggc ggcggcgcg gcggcggcag gagaatggca tcagaactgg	840
caatgagcaa ctccgacctg cccaccagtc cctggccat ggaatatgtt aatgacttcg	900
atctgatgaa gtttgaagtg aaaaaggaac cggtagagac cgaccgcac atcagccagt	960
gcggccgtct catcgccggg ggctcgctgt cctccacccc catgagcacg ccgtgcagct	1020
cggtagcccc ttccccagc ttctcggcgc ccagcccggg ctcgggcagc gagcagaagg	1080
cgcacctgga agactactac tggatgaccg gctacccgca gcagctgaac cccgaggcgc	1140

ES 2 906 586 T3

tgggcttcag	ccccgaggac	gcggtcgagg	cgctcatcag	caacagccac	cagctccagg	1200
gcggcttcga	tggctacgcg	cgcggggcgc	agcagctggc	cgcggcgggc	ggggccgggtg	1260
ccggcgccctc	cttggggcggc	agcggcgagg	agatggggccc	cgcgcgccgc	gtggtgtccg	1320
ccgtgatcgc	cgcggccgcc	gcgcagagcg	gcgcggggccc	gcactaccac	caccaccacc	1380
accacgcccgc	cggccaccac	caccacccga	cggccggcgc	gcccggcgcc	gcgggcagcg	1440
cggccgcctc	ggccgggtggc	gctggggggcg	cgggcggcgg	tggcccggcc	agcgtgggg	1500
gcggcgggcg	cggcgggcggc	ggcggaggcg	gcggggggcgc	ggcggggggcg	gggggcgccc	1560
tgcacccgca	ccacgccgcc	ggcggcctgc	acttcgacga	ccgcttctcc	gacgagcagc	1620
tggtgaccat	gtctgtgcg	gagctgaacc	ggcagctgcg	cggggtcagc	aaggaggagg	1680
tgatccggct	gaagcagaag	aggcggaccc	tgaaaaaccg	cggctatgcc	cagtccctgcc	1740
gcttcaagag	ggtgcagcag	agacacgtcc	tggagtcgga	gaagaaccag	ctgctgcagc	1800
aagtgcacca	cctcaagcag	gagatctcca	ggctgggtgcg	cgcagagggac	gcgtacaagg	1860
agaaatacga	gaagttggtg	agcagcggct	tccgagaaaa	cggctcgagc	agcgacaacc	1920
cgtcctctcc	cagatttttc	atgtgagtct	gacacgcgat	tccagctagc	caccctgata	1980
agtgtccgc	gggggtccgg	ctcgggtgtg	ggcttgctag	ttctagagcc	atgtcgcga	2040
ccacctcacc	acccccaccc	ccaccgagtt	tggccccctt	ggccccctac	acacacacaa	2100
acccgcacgc	acacaccaca	cacacacaca	cacacacaca	cacacccac	accctgctcg	2160
agtttgtggt	ggtgggtggct	gttttaaact	ggggagggaa	tgggtgtctg	gctcatggat	2220
tgccaatctg	aaattctcca	taacttgcta	gcttggtttt	tttttttttt	tacaccccc	2280
cgccccaccc	ccggacttgc	acaatgttca	atgatctcag	cagagttctt	catgtgaaac	2340
gttgatcacc	tttgaagcct	gcatcattca	catatttttt	cttcttcttc	cccttcagtt	2400
catgaactgg	tgttcatttt	ctgtgtgtgt	gtgtgtttta	ttttgttttg	attttttttt	2460
ttaattttac	ttttagagct	tgctgtgttg	cccacctttt	ttccaacctc	cacctcact	2520
ccttctcaac	ccatctcttc	cgcgatgaaa	gaaaaaaaaa	agcaaagttt	ttttttcttc	2580
tcctgagttc	ttcatgtgag	attgagcttg	caaaggaaaa	aaaaatgtga	aatgttatag	2640
acttgcagcg	tgccgagttc	catcgggttt	tttttttagc	attgttatgc	taaaatagag	2700
aaaaaatcc	tcatgaacct	tccacaatca	agcctgcac	aaccttctgg	gtgtgacttg	2760
tgagttttgg	ccttgtgatg	ccaaatctga	gagtttagtc	tgccattaaa	aaaactcatt	2820
ctcatctcat	gcattattat	gcttgctact	ttgtcttagc	aacaatgaac	tataactggt	2880
tcaaagactt	tatggaaaag	agacattata	ttaataaaaa	aaaaaagcct	gcatgctgga	2940
catgtatggt	ataattattt	tttccttttt	tttccttttt	ggcttgga	tggacgttcg	3000

ES 2 906 586 T3

aagacttata	gcatggcatt	catacttttg	ttttattgcc	tcatgacttt	tttgagttta	3060
gaacaaaaa	gtgcaaccgt	agagccttct	tcccatgaaa	ttttgcatct	gtcccaaac	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	ccattatttt	tggtttgttt	tattttttatt	3360
ttatatTTTT	tggcttttgg	tcattgtcaa	atgtggaatg	ctctgggttt	ctagtatata	3420
atttaattct	agtttttata	atctgttagc	ccagttaaaa	tgtatgctac	agataaagga	3480
atgttataga	taaatttgaa	agagttaggt	ctgttttagct	gtagattttt	taaacgattg	3540
atgcactaaa	ttgtttacta	ttgtgatgtt	aaggggggta	gagtttgcaa	ggggactggt	3600
taaaaaaagt	agcttataca	gcatgtgctt	gcaacttaaa	tataagttgg	gtatgtgtag	3660
tctttgctat	accactgact	gtattgaaaa	ccaaagtatt	aagaggggaa	acgccctgt	3720
ttatatctgt	aggggtatTT	tacattcaaa	aatgtatgtt	tttttttctt	ttcaaaatta	3780
aagtatttgg	gactgaattg	cactaagata	taacctgcaa	gcatataata	caaaaaaaaa	3840
ttgcaaaact	gtttagaacg	ctaataaaat	ttatgcagtt	ataaaaatgg	cattactgca	3900
cagttttaag	atgatgcaga	tttttttaca	gttgatttgt	ggtgcagaac	tggattttct	3960
gtaacttaaa	aaaaaatcca	cagttttaaa	ggcaataatc	agtaaatgtt	atttttcaggg	4020
actgacatcc	tgtcttttaa	aagaaatgaa	aagtaaatct	taccacaata	aatataaaaa	4080
aatcttgtca	gttacttttc	ttttacatat	tttgctgtgc	aaaattgttt	tatatcttga	4140
gttactaact	aaccacgcgt	gttgttccta	tgtgcttttc	tttcattttc	aattctgggt	4200
atatcaagaa	aagaataatc	tacaataata	aacggcattt	ttttttgatt	ctgtactcag	4260
tttcttagtg	tacagtttaa	ctgggcccaa	caacctcggt	aaaagtgtaa	aatgcacctc	4320
tttctccagt	ggaaggattc	ctggaggaat	agggagacag	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	cgtttgcctt	4680
ttcactaaag	ttgactatTT	ttccttcttc	tcttacacac	cgagattttc	ttgttagcaa	4740
ggcctgacaa	gatttaacat	aaacatgaca	aatcatagtt	gtttgttttg	ttttgctttt	4800
ctctttaaca	ctgaagatca	tttgtcttaa	ataggaaaaa	gaaaatccac	tccttacttc	4860
catatttcca	agtacatatc	tggttttaa	tatgttatca	aatcatatTT	caccgtgaat	4920

attcagtgga	gaacttctct	acctggatga	gctagtaatg	atttcagatc	atgctatccc	4980
cagaaataaa	agcaaaaaat	aatacctgtg	tggaatatag	gctgtgcttt	gatttactgg	5040
tatttaccct	aaaataggct	gtgtatggg	gctgacttaa	agatcccttg	gaaagactca	5100
aaactacctt	cactagtagg	actcctaagc	gctgacctat	ttttaaatga	cacaaattca	5160
tgaaactaat	gttacaaatt	catgcagttt	gcactcttag	tcatcttccc	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
gtcttaatat	taaacctccc	ctcatgagct	tgaagtcaag	tgttcttgac	ttcagatatt	5580
tctttccttt	tttttttttt	ttcctcatca	caactaagag	atacacaac	tctgaagaag	5640
cagaaatgga	gagaatgctt	ttaacaaaaa	agcatctgat	gaaagatttt	aggcaaacat	5700
tctcaaaata	agagtgatat	tctggatgta	gttattgcag	ttatctcatg	acaaatgagg	5760
cctggattgg	aaggaaaata	tagttgtgta	gaattaagca	ttttgatagg	aatctacaag	5820
gtagttgaat	ataataagca	ggtttggggc	cccaaacttt	agaaaatcaa	atgcaaagg	5880
gctggcaaaa	atgaggtttg	agtggctggc	tgtaagagaa	ggttaactcc	tagtaaaagg	5940
cattttttaga	aataacaatt	actgaaaact	ttgaagtata	gtgggagtag	caaacaata	6000
catgtttttt	ttttcttaca	aagaactcct	aaatcctgag	taagtgccat	tcattacaat	6060
aagtctctaa	atttaaaaaa	aaaaaatca	tatgaggaaa	tctagctttc	ccctttacgc	6120
tgcgtttgat	ctttgtctaa	atagtgttaa	aattcctttc	attccaatta	cagaactgag	6180
cccactcgca	agttggagcc	atcagtggga	tacgccacat	tttgggaagg	ccagcatcgt	6240
gtacttacca	gtgtgttcac	aaaatgaaat	ttgtgtgaga	gctgtacatt	aaaaaaaaatc	6300
atcattatta	ttattatttg	cagtcatgga	gaaccaccta	cccctgactt	ctgttttagtc	6360
tcctttttta	ataaaaatta	ctgtgtttaga	gaagaaggct	attaaatgta	gtagttaact	6420
atgcctcttg	tctgggggtt	tcatagagac	cggtaggaaa	gcgcactcct	gcttttcgat	6480
ttatggtgtg	tgcaagtaaa	caggtgcatt	gctttcaacc	tgccatacta	gttttaaaaa	6540
ttcactgaaa	ttacaaagat	acatatatat	gcatatatat	aatggaaagt	ttcccggaat	6600
gcaacaatta	gcatttttaa	atcatatata	ggcatgcaca	ttctaaatag	tacttttttca	6660
tgcttcattg	tttctctggc	agataatttt	actaagaaga	aaaatagata	ttogactccc	6720
cttccctaaa	caaatccacg	ggcagaggct	ccagcggagc	cgagccccct	ggttttctcg	6780

taggccctag acggtgttgc atttatcagt gatgtcaaac gtgctcattt gtcagacata 6840
gctgtaaatg aaaacaatgt gtggcaaat acaaagtt 6878

<210> 2

<211> 2656

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

gaggctttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggcttggcc	60
tccccctccc ccctttgctc tctgcctcgt ctttccccag gacttcgcta ttttgctttt	120
ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcctccagtc gggctgcacc	180
tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa	240
aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt	300
gccaaaggccc gcgcgcgccg gacagacgcc cgcgcgcct ccagccccga ggggacgccg	360
cgcgcgcctt gcctgcagcc cgggcccggc aggcgagccc ttccttatgc aaagcgcgca	420
gcggagcggc gagcggggga cgcgcgcac cgggcccggc tcctccagct tcgcgcgcgc	480
agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct	540
cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggccggggc gagcgaggga gcacattggc	600
gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg ggggtgtgtgt	660
gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgcgcgc aagctagaag cggcccagcc	720
cggcaagctg gctcaccgc tggccacca gcacagcccg ctggcccctc tcctgcagcc	780
catctggcgg agcggcggcg gcggcggcg cggcggcagg agaatggcat cagaactggc	840
aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttcga	900
tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatca tcagccagtg	960
cggccgtctc atcgccgggg gctcgctgtc ctccaccccc atgagcacgc cgtgcagctc	1020
ggtgccccct tccccagct tctcggcgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc	1080
gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcag cagctgaacc ccgaggcgct	1140
gggcttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg	1200
cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcgccg gggccggctg	1260
cggcgctcc ttggggcgca gcggcgagga gatgggcccc gccgcgcgc tgggtgtccgc	1320
cgtgatcgcc gcggccgcgc gcgagagcgg cgcgggcccc cactaccacc accaccacca	1380
ccacgccgcc ggccaccacc accacccgac ggccggcgcg cccggcgccg cgggcagcgc	1440
ggccgcctcg gccggtggcg ctggggggcg gggcgggcgt ggcccgcca gcgctggggg	1500
cggcgggcgg gccggcggcg gcggaggcgg cggggggcg gcggggcggg ggggcgcct	1560

gcacccgcac cacgccgccg gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct	1620
ggtgaccatg tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt	1680
gatccggctg aagcagaaga ggccggaccct gaaaaaccgc ggctatgccc agtcctgccg	1740
cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca	1800
agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctgggtgcgc gagagggacg cgtacaagga	1860
gaaatacgag aagttggtga gcagcggctt ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaaccc	1920
gtcctctccc gagtttttca taactgagcc cactcgcaag ttggagccat cagtgggata	1980
cgccacatth tggaagcccc agcatcgtgt acttaccagt gtgttcacaa aatgaaatth	2040
gtgtgagagc tgtacattaa aaaaaatcat cattattatt attatttgca gtcattggaga	2100
accacctacc cctgacttct gtttagtctc ctttttaaat aaaaattact gtgttagaga	2160
agaaggctat taaatgtagt agttaactat gcctcttgtc tgggggtttc atagagaccg	2220
gtaggaaagc gcactcctgc ttttcgattt atgggtgtgtg caagtaaaca ggtgcattgc	2280
tttcaacctg ccatactagt tttaaaaatt cactgaaatt acaaagatac atatatatgc	2340
atatatataa tggaaagttt cccggaatgc aacaattagc attttaaaat catatatagg	2400
catgcacatt cttaaatagt ctttttcatg cttcattgtt tctctggcag ataattttac	2460
taagaagaaa aatagatatt cgactccctt tccctaaaca aatccacggg cagaggctcc	2520
agcggagccg agccccctgg ttttctcgta ggccctagac ggtgttgcat ttatcagtga	2580
tgtcaaacgt gtcattttgt cagacatagc tgtaaatgaa aacaatgtgt ggcaaaatac	2640
aaagttaaaa aaaaaa	2656

<210> 3

<211> 6887

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 906 586 T3

gaggctttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggcttggcc	60
tccccctccc ccctttgctc tctgcctcgt ctttccccag gaattogeta ttttgctttt	120
ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcctccagtc gggctgcacc	180
tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa	240
aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccct	300
gccaaggccc gcgcgcgccg gacagacgcc cgccgcgcct ccagccccga gcggacgccg	360
cgcgcgccct gcctgcagcc cgggccggcg aggcgagccc ttccttatgc aaagcgcgca	420
gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggccgggc tcctccagct tcgccgccgc	480
agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct	540

ES 2 906 586 T3

cggcgcgcaa ggagggcgagc gagcaaggag gggccggggc gagcgagggg gcacattggc	600
gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg ggggtgtgtgt	660
gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cggcccagcc	720
cggcaagctg gctcaccgcg tggccacca gcacagcccg ctggccctc tcctgcagcc	780
catctggcgg agcggcgggc gcggcgggc cggcggcagg agaattggcat cagaactggc	840
aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttcga	900
tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatca tcagccagt	960
cggccgtctc atcgccgggg gctcgtgtc ctccaccccc atgagcacgc cgtgcagctc	1020
ggtgccccct tccccagct tctcggcgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc	1080
gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctacccgcag cagctgaacc ccgaggcgct	1140
gggcttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg	1200
cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcgggcg gggccggtgc	1260
cggcgccctc ttggggcgga gcggcgagga gatgggcccc gccgcccgcg tgggtgtccgc	1320
cgtgatcgcc gcggccggcg cgagagcggc cgcgggcccc cactaccacc accaccacca	1380
ccacgcgcgc ggccaccacc accaccgcac ggccggcgcg cccggcgccg cgggcagcgc	1440
ggccgcctcg gccgggtggc ctggggggcg gggcgggcgt ggcccgccca gcgctggggg	1500
cggcgggcgc ggcgggcggc gcggaggcgc cgggggcgcgc gcggggggcg ggggcgcct	1560
gcacccgcac cagcccgccg gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct	1620
ggtgaccatg tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt	1680
gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc ggctatgcc agtcctgccg	1740
cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca	1800
agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctgggtgcgc gagagggacg cgtacaagga	1860
gaaatacgag aagttgggtg gcagcggctt ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaacc	1920
gtcctctccc gagtttttca tgtgagctg acacgcgatt ccagctagcc accctgataa	1980
gtgctccgcg ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgctagt tctagagcca tgctcgccac	2040
cacctacca cccccacccc caccgagttt ggcccccttg gccccctaca cacacacaaa	2100
ccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac acacccaca ccctgctcga	2160
gtttgtggtg gtggtggctg ttttaactg gggagggaat ggggtgtctgg ctcatggatt	2220
gccaatctga aattctccat aacttgctag cttgtttttt tttttttttt acaccccccc	2280
gccccacccc cggacttgca caatgttcaa tgatctcagc agagttcttc atgtgaaacg	2340
ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atattttttt ttcttcttcc ccttcagttc	2400
atgaactggt gttcattttc tgtgtgtgtg tgtgttttat tttgttttga tttttttttt	2460

taat t t t t t a c t	t t t a g a g c t t	g c t g t g t t g c	c c a c c t t t t t	t c c a a c c t c c	a c c c t c a c t c	2520
c t t c t c a a c c	c a t c t c t t c c	g a g a t g a a a g	a a a a a a a a a a	g c a a a g t t t t	t t t t t c t t c t	2580
c c t g a g t t c t	t c a t g t g a g a	t t g a g c t t g c	a a a g g a a a a a	a a a a t g t g a a	a t g t t a t a g a	2640
c t t g c a g c g t	g c c g a g t t c c	a t c g g g t t t t	t t t t t t a g c a	t t g t t a t g c t	a a a a t a g a g a	2700
a a a a a a t c c t	c a t g a a c c t t	c c a c a a t c a a	g c c t g c a t c a	a c c t t c t g g g	t g t g a c t t g t	2760
g a g t t t t g g c	c t t g t g a t g c	c a a a t c t g a g	a g t t t a g t c t	g c c a t t a a a a	a a a c t c a t t c	2820
t c a t c t c a t g	c a t t a t t a t g	c t t g c t a c t t	t g t c t t a g c a	a c a a t g a a c t	a t a a c t g t t t	2880
c a a a g a c t t t	a t g g a a a a g a	g a c a t t a t a t	t a a t a a a a a a	a a a a a g c c t g	c a t g c t g g a c	2940
a t g t a t g g t a	t a a t t a t t t t	t t c c t t t t t t	t t t c c t t t t g	g c t t g g a a a t	g g a c g t t c g a	3000
a g a c t t a t a g	c a t g g c a t t c	a t a c t t t t t g t	t t t a t t g c c t	c a t g a c t t t t	t t g a g t t t a g	3060
a a c a a a a c a g	t g c a a c c g t a	g a g c c t t c t t	c c c a t g a a a t	t t t g c a t c t g	c t c c a a a a c t	3120
g c t t t g a g t t	a c t c a g a a c t	t c a a c c t c c c	a a t g c a c t g a	a g g c a t t c c t	t g t c a a a g a t	3180
a c c a g a a t g g	g t t a c a c a t t	t a a c c t g g c a	a a c a t t g a a g	a a c t c t t a a t	g t t t t c t t t t	3240
t a a t a a g a a t	g a c g c c c c a c	t t t g g g g a c t	a a a a t t g t g c	t a t t g c c g a g	a a g c a g t c t a	3300
a a a t t t a t t t	t t t a a a a a g a	g a a a c t g c c c	c a t t a t t t t t	g g t t t g t t t t	a t t t t t a t t t	3360
t a t a t t t t t t	g g c t t t t g g t	c a t t g t c a a a	t g t g g a a t g c	t c t g g g t t t c	t a g t a t a t a a	3420
t t t a a t t c t a	g t t t t t a t a a	t c t g t t a g c c	c a g t t a a a a t	g t a t g c t a c a	g a t a a a g g a a	3480
t g t t a t a g a t	a a a t t t g a a a	g a g t t a g g t c	t g t t t a g c t g	t a g a t t t t t t	a a a c g a t t g a	3540
t g c a c t a a a t	t g t t t a c t a t	t g t g a t g t t a	a g g g g g g t a g	a g t t t g c a a g	g g g a c t g t t t	3600
a a a a a a a g t a	g c t t a t a c a g	c a t g t g c t t g	c a a c t t a a a t	a t a a g t t g g g	t a t g t g t a g t	3660
c t t t g c t a t a	c c a c t g a c t g	t a t t g a a a a c	c a a a g t a t t a	a g a g g g g a a a	c g c c c c t g t t	3720
t a t a t c t g t a	g g g g t a t t t t	a c a t t c a a a a	a t g t a t g t t t	t t t t t t c t t t	t c a a a a t t a a	3780
a g t a t t t g g g	a c t g a a t t g c	a c t a a g a t a t	a a c c t g c a a g	c a t a t a a t a c	a a a a a a a a a t	3840
t g c a a a a c t g	t t t a g a a c g c	t a a t a a a a t t	t a t g c a g t t a	t a a a a a t g g c	a t t a c t g c a c	3900
a g t t t t a a g a	t g a t g c a g a t	t t t t t t a c a g	t t g t a t t g t g	g t g c a g a a c t	g g a t t t t c t g	3960
t a a c t t a a a a	a a a a a t c c a c	a g t t t t a a a g	g c a a t a a t c a	g t a a a t g t t a	t t t t c a g g g a	4020
c t g a c a t c c t	g t c t t t a a a a	a g a a a t g a a a	a g t a a a t c t t	a c c a c a a t a a	a t a t a a a a a a	4080
a t c t t g t c a g	t t a c t t t t c t	t t t a c a t a t t	t t g c t g t g c a	a a a t t g t t t t	a t a t c t t g a g	4140
t t a c t a a c t a	a c c a c g c g t g	t t g t t c c t a t	g t g c t t t t c t	t t c a t t t t c a	a t t c t g g t t a	4200
t a t c a a g a a a	a g a a t a a t c t	a c a a t a a t a a	a c g g c a t t t t	t t t t t g a t t c	t g t a c t c a g t	4260
t t c t t a g t g t	a c a g t t t a a c	t g g g c c c a a c	a a c c t c g t t a	a a a g t g t a a a	a t g c a t c c t t	4320

ttctccagtg	gaaggattcc	tggaggaata	gggagacagt	aattcagggt	gaaattatag	4380
gctgtttttt	gaagtgagga	ggctggcccc	atatactgat	tagcaatatt	taatatagat	4440
gtaaattatg	acctcaat	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	tgactat	ttcttcttct	cttacacacc	gagattttct	tgttagcaag	4740
gcctgacaag	atttaacata	aacatgacaa	atcatagttg	tttgttttgt	tttgcttttc	4800
tctttaaacac	tgaagatcat	ttgtcttaaa	taggaaaaag	aaaatccact	ccttacttcc	4860
atatttccaa	gtacatatct	ggtttaaact	atgttatcaa	atcatatttc	accgtgaata	4920
ttcagtgag	aacttctcta	cctggatgag	ctagtaatga	tttcagatca	tgctatcccc	4980
agaaataaaa	gcaaaaaata	atacctgtgt	ggaatatagg	ctgtgctttg	atttactggt	5040
atttacccca	aaataggctg	tgtatggggg	ctgacttaaa	gatcccttgg	aaagactcaa	5100
aactaccttc	actagtagga	ctcctaagcg	ctgacctatt	tttaaatgac	acaaattcat	5160
gaaactaatg	ttacaaattc	atgcagtttg	cactcttagt	catcttcccc	tagcacacca	5220
atagaatgtt	agacaaagcc	agcactgttt	tgaaaataca	gccaaacacg	atgacttttg	5280
ttttgttttc	tgccgttctt	aaaagaaaaa	aagataatat	tgcaactctg	actgaaagac	5340
ttatttttaa	gaaaacaggt	tgtgtttggt	gctgctaagt	tctggccagt	ttatcatctg	5400
gccttcctgc	ctatttttta	caaaacacga	agacagtgtg	taacctcgac	attttgacct	5460
tcctttatgt	gctagtttag	acaggctcct	gaatccacac	ttaattttgc	ttaacaaaag	5520
tcttaatagt	aaacctcccc	tcatgagctt	gaagtcaagt	gttcttgact	tcagatat	5580
ctttcctttt	tttttttttt	tcctcatcac	aactaagaga	tacacaaact	ctgaagaagc	5640
agaaatggag	agaatgcttt	taacaaaaaa	gcatctgatg	aaagatttta	ggcaaacatt	5700
ctcaaaataa	gagtgatatt	ctggatgtag	ttattgcagt	tatctcatga	caaatgaggc	5760
ctggattgga	aggaaaatat	agttgtgtag	aattaagcat	tttgatagga	atctacaagg	5820
tagttgaata	taataagcag	gtttggggccc	ccaaacttta	gaaaatcaaa	tgcaaagggtg	5880
ctggcaaaaa	tgaggtttga	gtggctggct	gtaagagaag	gttaactcct	agtaaaaggc	5940
atttttagaa	ataacaatta	ctgaaaactt	tgaagtatag	tgaggagtagc	aaacaaatac	6000
atgttttttt	tttcttacia	agaactccta	aatcctgagt	aagtgccatt	cattacaata	6060
agtctctaaa	tttaaaaaaa	aaaaaatcat	atgaggaaat	ctagctttcc	cctttacgct	6120
gcgtttgatc	tttgtctaaa	tagtggttaa	attcctttca	ttccaattac	agaactgagc	6180
ccactcgcaa	gttgaggcca	tcagtgggat	acgccacatt	ttggaagccc	cagcatcggtg	6240

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

<210> 4

<211> 403

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Tyr Ala Arg Gly Ala Gln Gln Leu Ala Ala Ala Ala Gly Ala
 130 135 140
 Gly Ala Gly Ala Ser Leu Gly Gly Ser Gly Glu Glu Met Gly Pro Ala
 145 150 155 160
 Ala Ala Val Val Ser Ala Val Ile Ala Ala Ala Ala Gln Ser Gly
 165 170 175
 Ala Gly Pro His Tyr His His His His His His Ala Ala Gly His His
 180 185 190
 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

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

Met	Ala	Ser	Glu	Leu	Ala	Met	Ser	Asn	Ser	Asp	Leu	Pro	Thr	Ser	Pro	1	5	10	15
Leu	Ala	Met	Glu	Tyr	Val	Asn	Asp	Phe	Asp	Leu	Met	Lys	Phe	Glu	Val	20	25	30	
Lys	Lys	Glu	Pro	Val	Glu	Thr	Asp	Arg	Ile	Ile	Ser	Gln	Cys	Gly	Arg	35	40	45	
Leu	Ile	Ala	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Pro	Met	Ser	Thr	Pro	Cys	50	55	60	
Ser	Ser	Val	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Phe	Ser	Ala	Pro	Ser	Pro	Gly	Ser	65	70	75	80
Gly	Ser	Glu	Gln	Lys	Ala	His	Leu	Glu	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Met	Thr	Gly	85	90	95	
Tyr	Pro	Gln	Gln	Leu	Asn	Pro	Glu	Ala	Leu	Gly	Phe	Ser	Pro	Glu	Asp	100	105	110	
Ala	Val	Glu	Ala	Leu	Ile	Ser	Asn	Ser	His	Gln	Leu	Gln	Gly	Gly	Phe	115	120	125	
Asp	Gly	Tyr	Ala	Arg	Gly	Ala	Gln	Gln	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	130	135	140	
Gly	Ala	Gly	Ala	Ser	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Glu	Glu	Met	Gly	Pro	Ala	145	150	155	160
Ala	Ala	Val	Val	Ser	Ala	Val	Ile	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gln	Ser	Gly	165	170	175	
Ala	Gly	Pro	His	Tyr	His	His	His	His	His	His	Ala	Ala	Gly	His	His	180	185	190	

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Phe Phe Met
370

<210> 6

<211> 19

<212> ARN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> ARNip específico de c-MAF	
	<400> 11	
	acaaggagaa auacgagaag	20
	<210> 12	
	<211> 20	
10	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip específico de c-MAF	
	<400> 12	
15	accuggaaga cuacuacugg	20
	<210> 13	
	<211> 13878	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 13	

aactatata	taaacacctc	cggctctgaga	ggccgtgttg	ggtgtctttg	tcaggtgaag	60
aaagagaaga	aggctggtac	accttcccag	gaattctcac	tgaagaaaac	atctggattt	120
tttacatctc	ttgtgcaaaa	caaacaaaga	tttcattaag	tgatgtatat	tgttttccaa	180
ggaagaaacc	tgagagaca	aaaacaaata	agcaaataat	tgaacaaaa	atatgataaa	240
cccccaaatt	cttccagtgc	taattttactt	gttatcatgg	ttctctacaa	aggcagagat	300
cactaattac	aggtttttcc	agaattcaca	tttcacgtca	agatcatcca	atccaaacag	360
tgtacggaaa	gcctagggcc	ttcttcaactt	tgccccctac	cccaccctac	acacacgccc	420
ccatctaaat	gatacccttg	gaaagaaacc	tacacatctc	atttgtctat	attttgcttc	480
ctccctcgcc	tcccggtaac	caaagtgtgag	ttgttctcta	actgcactgg	agaatcagaa	540
tttattgtac	atatgtttgt	gttccactta	ataaaaaaac	ctatatattta	agataaaactt	600
tgtagtaaat	tcagaggtta	agtgactatt	tatgctaatac	aggcagaaat	atattctcaa	660
gcataatgca	ttacataaat	ttgaatgtaa	aatgttcaat	tatgaagtaa	atacaggtaa	720
tgcaaataat	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	aatcaattt	agttggtttc	1140
atagtgaat	ttagtggaca	ctggttagtt	ctgccccata	aatcagccc	ctaaacaaag	1200
agtccagaca	ccatacctga	tgcatcccat	tctattcaga	ttatggatgt	ctgattccaa	1260
catgatatat	ttgagttgct	ataactcaca	atcggggaaa	atatattcct	ttaagctttt	1320
aatctttgta	atgttgacat	gaacaggggt	tttgtttttc	atttttgcat	gaagtcatta	1380
tgtatgtact	gacgtgaaac	tataattgtg	tttctgatgt	tactgtgtca	caatattcta	1440
tgogatgtaa	cccatgtcct	cctccccctc	acaaatctcc	tataaatatt	cattgctttc	1500

aaaaacttta	atactactgg	tccgaattgg	tcaataatga	caaatgcatg	gtttctaaat	1560
tactgtatat	tgttctacag	agattactag	agtatatata	gcaaggggat	gttaagcagt	1620
aagaaaacac	agttcacatt	gtatttggat	tagattggct	tggatagaag	tgaaacaaac	1680
aatgttagca	aagaagtcta	aagacatgtg	gccactgta	attgtacaga	atcaaaaacc	1740
tgaatagtac	tcattaaaat	gagagagctc	aattgttata	aaagaaatgc	tgctaacaga	1800
gaactgtaaa	tgtttagaca	cccctgtgaa	tcactaaata	ataatgtaaa	aaggataaaa	1860
atgagaatta	agttataagc	ctgagagcat	tactgctaca	catctaaaaa	aataattctg	1920
atcctctctt	ttttttttcc	aagagaaaat	gggcgactat	aaaagacctt	gcaataagag	1980
aaataaaaat	accatgtctt	cacagcagtg	tacataaata	aaccataaaa	atgtgcagat	2040
aataatatat	ttagctgccc	aaacatgggc	atttaatttc	tagaaatgat	atataacaat	2100
gtaacaatta	gatactcagc	catgaatgtg	tatggcacag	tcttcatcat	tagcaaactt	2160
tgtgtataaa	atattattta	ttatttatta	taatactgct	ttcagaggca	atgatcatac	2220
cttacagctt	ttaacacaaa	tatgatgcaa	aaggattaaa	agtatatcat	aaacaaacaa	2280
taaattcttt	ctaaatacac	ttaaattcat	attttacatg	aaaaatataa	acttcctaca	2340
tttgtgacta	ctgactttta	aaaagaccta	gaaaactatt	gttacgggca	atgttaaattg	2400
acataatgct	tatgtaattg	aaagtgtgga	ttttcctcta	aataaaactat	aatcccttaa	2460
cttcattact	agggaaaata	ttgttaaaga	gaaggaaagc	aagggaattc	tgctaggttg	2520
cataaatatt	gacataatct	tcactctttc	ttccccaaac	tggtaataga	catagtttat	2580
tccacccaac	aaaatgctct	tataagacca	aaactaccct	tattaacaac	ttctctgcag	2640
tcacgatgaa	aagaaacact	acttgtctga	aaaataccga	cagcgtgcc	cttttcagat	2700
tagggtgtgc	ctacgaatct	tttgggaagt	cttcatttaa	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	agggtgtctg	tatcccctgg	cctctttgtc	3180
aacaatcaag	gagaagagga	ggggcaaaaa	tgatctctgc	atctgccagc	actttcttcg	3240
gcccttttcc	tatagggctg	ggttctccca	cttcagtcaa	actaaacttg	tgtgtctctt	3300
tcctcctccc	acactgggta	accagctgct	tttcacttca	tcgacaaaac	tggacacgga	3360
tcaatttcaa	ctgacctttg	ccgaaagggtg	gcgctgttga	ggtaaaaaac	aactcgctcc	3420

aacaatagtt	tccactcttc	gacccctttg	caggcttttc	agaatTTTTT	TTTTTTTTT	3480
atgcaccctc	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	tgcataaaact	tttagagaat	caatctagaa	atttgaacta	3780
cttattagca	tttgcaactg	ggggtggggg	gagcagcctc	ccccacccca	ccccccactc	3840
tgcgtttccg	gactagttcc	agaaaccgcg	gtttaaaatt	taacccttcg	agggtagctg	3900
gtgagggctg	gggtattgtt	tttccccctt	gctccctgcc	acgatcaagt	ccgaaataat	3960
taaaggaaac	gtaaaagtgc	aaagggcgcg	cctgaccctg	ataaacagag	gtcagatttc	4020
gtaaggggac	gggtgagtgt	gagtgtgtgt	gtgtttgtgt	gtgtgtgtgt	aagagagaga	4080
gagagcgagc	gcgcaatatg	agtctcaaag	gccaaaactcc	ggccagtcag	gagccggaag	4140
gctgagcccg	gctgacctga	ctttgagctt	ccccggagtt	atctcgcata	ggcgctcgct	4200
ctgtccaagg	gcacgcgacg	ccagcgggca	gccggtctcc	gtgaagaatg	gcctctaaac	4260
aaactatttt	acctcgttgt	aaagagaggg	ataaaatggg	ctttccctct	ccacggatgc	4320
ccagccttct	gggcaggcgc	atggccgggc	ggcgccagc	ccgcagcccc	gatccggaca	4380
ccccactgca	tccctccctt	cccgttccct	tccccgcacg	ggcgcccgag	agacggacaa	4440
agagttgggg	ccaagtttga	gcgcggggca	cggccaggct	cagggaaagga	aggtccccgg	4500
cagacacctg	ggtaccagag	ttggtgcgag	gaggaaaagc	tgggaggcga	attcacaatc	4560
ctgggggtgg	agggcaggca	ggggagggga	atcaggccaa	tcccagccga	gtgagcccc	4620
agcgagctgg	ggctccggat	gggaggcctg	tctcgcgctc	caaagaaaag	caaaccgccc	4680
tcccaggtcc	gcccggattg	ccgaagcccc	tctggaaaaa	ctccttcccc	tcttacacca	4740
aaactttgcg	cgggcctcgt	tccctcccgg	gtaggcagcg	gcgcaggaag	ggttaagcca	4800
gcccgtccca	gctgacagtc	agctgattgg	gccctgattg	acagctccga	aaagtctcct	4860
tgtttctata	ctattatgct	aatcgcggcc	gctctcgccg	cctcccattg	gcccggagtg	4920
ccagtcaatt	tctcatttgg	acctgacgtc	acgagtgtta	taaaactcag	caattgcttt	4980
aaactcttct	tgttggtatc	gaggctttta	aatctTTTTT	catcttctag	ctgtagctcg	5040
ggctgcttgt	cggcttggcc	tccccctccc	ccctttgctc	tctgcctcgt	ctttccccag	5100
gacttcgcta	ttttgctttt	ttaaaaaaag	gcaagaaaga	actaaactcc	cccctccctc	5160
tcctccagtc	gggctgcacc	tctgccttgc	actttgcaca	gaggtagaga	gcgcgcgagg	5220
gagagagagg	aaagaaaaaa	aataataaag	agagccaagc	agaagaggag	gcgagaagca	5280

tgaagtgtta	actccccctg	gccaaaggccc	gcgccgccccg	gacagacgcc	cgccgcgcct	5340
ccagccccga	gcggacgccg	cgcgcgcctt	gcctgcagcc	cgggcccggcg	aggcgagccc	5400
ttccttatgc	aaagcgcgca	gcggagcggc	gagcggggga	cgccgcgcac	cgggcccggc	5460
tcctccagct	tcgcccgcgc	agccaccacc	gccgccaccg	cagctcgcgg	aggatcttcc	5520
cgagcctgaa	gccgccggct	cggcgcgcaa	ggaggcgagc	gagcaaggag	gggcccgggc	5580
gagcgaggga	gcacattggc	gtgagcaggg	gggaggagg	gcgggcgcgg	ggggcgcggg	5640
cagggcgggg	gggtgtgtgt	gtgagcgcgc	tcggaggttt	cgggccagcc	accgccgcgc	5700
aagctagaag	cgcgccagcc	cggcaagctg	gctcaccgcg	tggccacca	gcacagcccg	5760
ctggccccct	tcctgcagcc	catctggcgg	agcggcggcg	gcggcggcgg	cggcggcagg	5820
agaatggcat	cagaactggc	aatgagcaac	tccgacctgc	ccaccagtcc	cctggccatg	5880
gaatatgtta	atgacttcga	tctgatgaag	tttgaagtga	aaaaggaacc	ggtggagacc	5940
gaccgcatca	tcagccagtg	cggcgtcttc	atcgccgggg	gctcgtctgc	ctccaccccc	6000
atgagcacgc	cgtgcagctc	ggtgccccct	tccccagct	tctcggcgcc	cagcccgggc	6060
tcgggcagcg	agcagaaggc	gcacctggaa	gactactact	ggatgaccgg	ctaccgcgag	6120
cagctgaacc	ccgaggcgct	gggcttcagc	cccgaggacg	cggtcgaggc	gctcatcagc	6180
aacagccacc	agctccaggg	cggcttcgat	ggctacgcgc	gcggggcgca	gcagctggcc	6240
gcggcggccc	gggcccgtgc	cggcgcctcc	ttggggcgga	gcggcgagga	gatgggcccc	6300
gccgcgcgcg	tggtgtccgc	cgtgatcgcc	gcggccgcgc	cgcagagcgg	cgcgggcccc	6360
cactaccacc	accaccacca	ccacgcgcgc	ggccaccacc	accaccgcac	ggccggcgcg	6420
cccggcgccg	cgggcagcgc	ggcgcctcgc	gccgggtggc	ctggggggcg	gggcggcggt	6480
ggcccggcca	gcgttggggg	cggcggcggc	ggcggcgggc	gcggaggcgg	cgggggcgcg	6540
gcggggggcg	ggggcgccct	gcacccgcac	cacgcgcgcg	gcggcctgca	cttcgacgac	6600
cgtttctccg	acgagcagct	ggtgaccatg	tctgtgcgcg	agctgaaccg	gcagctgcgc	6660
ggggtcagca	aggaggaggt	gatccggctg	aagcagaaga	ggcggaccct	gaaaaaccgc	6720
ggctatgccc	agtcctgccg	cttcaagagg	gtgcagcaga	gacacgtcct	ggagtgcgag	6780
aagaaccagc	tgctgcagca	agtcgaccac	ctcaagcagg	agatctccag	gctggtgcgc	6840
gagagggacg	cgtacaagga	gaaatacgag	aagttggtga	gcagcggctt	ccgagaaaac	6900
ggctcgagca	gcgacaaccc	gtcctctccc	gagtttttca	tgtgagtctg	acacgcgatt	6960
ccagctagcc	accctgataa	gtgctccgcg	ggggctccgg	tcgggtgtgg	gcttgctagt	7020
tctagagcca	tgctcgccac	cacctacca	ccccacccc	caccgagttt	ggcccccttg	7080
gccccctaca	cacacacaaa	ccgcacgcga	cacaccacac	acacacacac	acacacacac	7140
acaccccaca	ccctgctcga	gtttgtgggt	gtgggtggctg	ttttaactg	gggagggaat	7200

gggtgtctgg	ctcatggatt	gccaatctga	aattctccat	aacttgctag	cttggttttt	7260
tttttttttt	acaccccccc	gccccacccc	cggacttgca	caatgttcaa	tgatctcage	7320
agagttcttc	atgtgaaacg	ttgatcacct	ttgaagcctg	catcattcac	atattttttc	7380
ttcttcttcc	ccttcagttc	atgaactggg	gttcattttc	tgtgtgtgtg	tgtgttttat	7440
tttgtttgga	tttttttttt	taattttact	tttagagctt	gctgtgttgc	ccaccttttt	7500
tccaacctcc	acctcactc	cttctcaacc	catctcttcc	gagatgaaag	aaaaaaaaaa	7560
gcaaagtttt	tttttcttct	cctgagttct	tcatgtgaga	ttgagcttgc	aaaggaaaaa	7620
aaaatgtgaa	atgttataga	cttgcagcgt	gccgagttcc	atcgggtttt	tttttttagca	7680
ttgttatgct	aaaatagaga	aaaaaatcct	catgaacctt	ccacaatcaa	gcctgcatca	7740
accttctggg	tgtgacttgt	gagttttggc	cttgtgatgc	caaactctgag	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	aaatttat	tttaaaaaga	gaaactgccc	cattattttt	8340
ggtttgtttt	atttttat	tatat	ggcttttggg	cattgtcaaa	tgtggaatgc	8400
tctgggtttc	tagtatataa	tttaattcta	gtttttataa	tctgttagcc	cagttaaaat	8460
gtatgctaca	gataaaggaa	tgttatagat	aaatttgaaa	gagttaggtc	tgttttagctg	8520
tagatttttt	aaacgattga	tgcaactaaat	tgtttactat	tgtgatgtta	aggggggtag	8580
agtttgcaag	gggactgttt	aaaaaaagta	gcttatacag	catgtgcttg	caacttaa	8640
ataagttggg	tatgtgtagt	ctttgctata	ccactgactg	tattgaaaac	caaagtatta	8700
agaggggaaa	cgccctgtt	tatatctgta	ggggat	acattcaaaa	atgtatgttt	8760
tttttcttt	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	ttttcaggga	ctgacatcct	gtctttaaaa	agaaatgaaa	agtaaatctt	9060

accacaataa atataaaaaa atcttgtcag ttacttttct tttacatatt ttgctgtgca	9120
aaattgtttt atatcttgag ttactaacta accacgcgtg ttgttcctat gtgcttttct	9180
ttcatTTTTca attctgggta tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatttt	9240
tttttgattc tgtactcagt ttcttagtgt acagtttaac tgggcccaac aacctcggtta	9300
aaagtgtaaa atgcatcctt ttctccagtg gaaggattcc tggaggaata gggagacagt	9360
aattcagggt gaaattatag gctgtttttt gaagtgagga ggctggcccc atatactgat	9420
tagcaatatt taatatagat gttaaattatg 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 tcaactaaagt tgactatttt tccttcttct cttacacacc	9720
gagattttct tgttagcaag gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagttg	9780
tttgttttgt tttgcttttc tctttaacac tgaagatcat ttgtcttaaa taggaaaaag	9840
aaaatccact ccttacttcc atatttccaa gtacatatct ggtttaaact atgttatcaa	9900
atcatatttc accgtgaata ttcagtggag 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
tttaaattgac acaaattcat gaaactaatg ttacaaattc atgcagtttg cactcttagt	10200
catcttcccc tagcacacca atagaatgtt agacaaagcc agcactgttt tgaaaataca	10260
gccaaacacg atgacttttg ttttgttttc tgccgttctt aaaagaaaaa aagataatat	10320
tgcaactctg actgaaagac ttatttttaa gaaaacaggt tgtgttttgt gctgctaagt	10380
tctggccagt ttatcatctg gccttcctgc ctatttttta caaaacacga agacagtgtg	10440
taacctcgac attttgacct tcctttatgt gctagtttag acaggctcct gaatccacac	10500
ttaattttgc ttaacaaaag tcttaatagt aaacctcccc tcatgagctt gaagtcaagt	10560
gttcttgact tcagatattt ctttcctttt tttttttttt tcctcatcac aactaagaga	10620
tacacaaact ctgaagaagc agaaatggag agaatgcttt taacaaaaaa gcatctgatg	10680
aaagattttt ggcaaacatt ctcaaaataa gagtgatatt ctggatgtag ttattgcagt	10740
tatctcatga caaatgaggc ctggattgga aggaaaatat agttgtgtag aattaagcat	10800
tttgatagga atctacaagg tagttgaata taataagcag gtttggggcc ccaaacttta	10860
gaaaatcaaa tgcaaggtg ctggcaaaaa tgaggtttga gtggctggct gtaagagaag	10920
gttaactcct agtaaaaggc attttttagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag	10980

tgaggagtagc	aaacaaatac	atgttttttt	tttcttacia	agaactccta	aatcctgagt	11040
aagtgccatt	cattacaata	agtctctaaa	tttaaaaaaa	aaaaaatcat	atgaggaaat	11100
ctagctttcc	cctttacgct	gcgtttgatc	tttgtctaaa	tagtggttaa	attcctttca	11160
ttccaattac	agaactgagc	ccactcgcaa	gttgaggcca	tcagtgggat	acgccacatt	11220
ttggaagccc	cagcatcgct	tacttaccag	tgtgttcaca	aatgaaatt	tgtgtgagag	11280
ctgtacatta	aaaaaatca	tcattattat	tattatttgc	agtcattggg	aaccacctac	11340
ccctgacttc	tgttttagct	ccttttttaa	taaaaattac	tgtgttagag	aagaaggcta	11400
ttaaatgtag	tagttaacta	tgcctcttgt	ctgggggttt	catagagacc	ggtaggaaag	11460
cgcactcctg	cttttcgatt	tatggtgtgt	gcaagtaaac	aggtgcattg	ctttcaacct	11520
gccatactag	ttttaaaaa	tcactgaaat	tacaaagata	catatatatg	catatatata	11580
atggaaagtt	tcccggaaat	caacaattag	catttttaaa	tcatatatag	gcatgcacat	11640
tctaaatagt	actttttcat	gcttcattgt	ttctctggca	gataatttta	ctaagaagaa	11700
aaatagatat	togactcccc	ttccctaaac	aaatccacgg	gcagaggctc	cagcggagcc	11760
gagccccctg	gtttttctgt	aggccctaga	cgggtgttgc	tttatcagtg	atgtcaaacg	11820
tgctcatttg	tcagacatag	ctgtaaatga	aaacaatgtg	tggcaaaata	caaagttagt	11880
taaatacaca	ccctctgtgt	gattttttgc	tcccttttct	tttttgctcc	tactcaaaaa	11940
aaaaaaaaatc	acctccttta	catttccctg	gcttcttgca	tgtttccctt	ttcaaaaaacc	12000
atgtaataat	tttttacaat	gtatctgaca	cattaatata	ttgacatcaa	ataggcagac	12060
attctacttt	tgcctggcaa	ataaatctgc	tacggagaca	tcatttcctc	actgtctcaa	12120
agccataact	acctgggagt	ctttcaacac	agaccctctc	gatgggaaat	gctgtttatt	12180
actgaatgca	ggatgctcac	gctctgatct	tttctccctt	gtgcctttac	cccagtcatt	12240
tttacttagc	aacaccaatt	ctagatactt	ctgttctgaa	gtagaaccac	ccccttgcca	12300
cactgccagt	tttcctgcta	aaagcagtgg	acagaagaca	gatcatggtc	acctcacaaa	12360
acatggcaca	cagctgtctc	ggtagctgca	ttcccagcat	gtcctgggtc	aaatatctag	12420
agttgcctat	gacacgttca	aaggttccca	agcacagtac	attgggaggc	ttttgctgct	12480
gtggccgttg	ttttcgttta	ggccaaacta	cttccgtatt	cacatactct	tggctttacg	12540
aaatacactc	ctccagtcta	ctaggccaat	caatatattt	aaaagtctga	ttgccacata	12600
agtctctctc	tctctctttt	tgttttttgt	ttgtttgttt	ttttctgttt	tggctgcogg	12660
tagttaaaga	ctgagatagg	ttggaagact	aaaatacagg	agtacatgag	tgacaacctt	12720
cagccgtctg	atttccatgc	cggtaaaaaca	cacaaccaag	ctcttcttag	cgtgctaata	12780
ataaacattc	actaagaggg	aataggaagt	gagatttacc	agcttcactt	tgtgtatttg	12840

ES 2 906 586 T3

caaggttccc cactacgatt cactgtcatt tgatTTTTga aaaataattt tgtccgtctc	12900
tttgaagaaa tgtcttagtt cttttatTTT gtttgTTtg ttttttttag agaagtttta	12960
tctgcagtga taggctacaa tttttatctc cgctgattat ttgtcaggat gctgaatgaa	13020
taatttggtc ctgtgccttc cttgttgTtc tgaggaaaat aagagaaact tggaagtttg	13080
tttcaactctt agcccatcct aaatctaaaa gaagatgtcc caggtcagg caggccatgt	13140
agtagttata aaggaggtgg tccaggcca gccacctcaa tcaggatttg tttgttttga	13200
agcatttgct taaaagcggg gcaagagtct taaccaact tgccataaca ctgcttttct	13260
cgcttttgat gtaaatcttc aaaattcaga catcaaacag cccagaaaaa ggggaattct	13320
ctccaggcat tgctccgccc cagctcctga acaaaccag ctctgtctag catttttttc	13380
cctagcgggg gtaggggaca gggtagaga atttcagtct cccaggctgt ctcatgattg	13440
ttagggcata aagaaacaca gtcccgccac aaattgggag catctttacc ctttagagag	13500
aaacaaaaaca aaactaaaca aacaaatcaa attgctttgc atgaaggcgt agcaaataaa	13560
atctcgggct cctgtttccc tgcaccattt gtaggaggtg agaaatgagg gaaacaagag	13620
aaaggggaac tttaaaagcg ggaggcccag aaataatccc tgttaccagt ctgaatttca	13680
cttgctccgt ggctaacgtc agacctagtg tgcatttatg ccagaagtaa actaggctcg	13740
gctgtccatt tttttaaaat atgttcacat gtttcctttt tgaaaacaat tttggggact	13800
aaacccaaat ggagagattt gaggaaatcg ttaatgtctt aacatttgag tatatttata	13860
aatgtatcag tctgtgat	13878

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para el diagnóstico de metástasis en un sujeto con cáncer de próstata y/o para el pronóstico de la tendencia a desarrollar metástasis en un sujeto con cáncer de próstata, comprendiendo dicho método:
 - 5 (i) cuantificar la amplificación o el número de copias de c-MAF en una muestra de tumor de próstata de dicho sujeto y
 - (ii) comparar la amplificación o el número de copias obtenido en (i) con la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en una muestra de control,
 - 10 en el que si la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en dicha muestra tumoral está aumentado con respecto a la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en la muestra de control, entonces dicho sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor tendencia a desarrollar metástasis.
2. Un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto con cáncer de próstata que comprende
 - 15 (i) cuantificar la amplificación o el número de copias de c-MAF en una muestra de tumor de próstata de dicho sujeto, y
 - (ii) comparar la amplificación o el número de copias obtenido en (i) con la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en una muestra de control,
 - 20 en el que si la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en la muestra de tejido tumoral está aumentado con respecto a la amplificación o el número de copias del gen c-MAF en la muestra de control, entonces dicho sujeto es susceptible a recibir una terapia destinada a prevenir, inhibir y/o tratar la metástasis del cáncer o una terapia para prevenir o inhibir la degradación ósea.
3. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la metástasis es metástasis ósea.
4. El método según la reivindicación 2, en el que la terapia dirigida a prevenir, inhibir y/o tratar la metástasis se selecciona del grupo que consiste en: un agente inhibidor de c-MAF; tratamientos sistémicos que incluyen pero no se limitan a quimioterapia, terapia hormonal e inmunoterapia; radioterapia; cirugía; un inhibidor de mTor; un inhibidor de Src cinasa; un antagonista de CCR5; un inhibidor de COX-2; Alfaradin y/o en el que la terapia para prevenir o inhibir la degradación ósea se selecciona del grupo que consiste en: un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, un inhibidor de PTH o PTHLH (incluyendo anticuerpos neutralizantes y péptidos), un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor dual de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógenos, calcitonina, radio-223 y un inhibidor de cathepsina K y combinaciones de los mismos.
 - 25
 - 30
5. El método según la reivindicación 4, en el que el inhibidor de RANKL se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo específico de RANKL, un nanocuerpo específico de RANKL, osteoprotegerina, el bisfosfonato es ácido zoledrónico o clodronato y el inhibidor dual de MET y VEGFR2 es cabozantinib.
 - 35
6. Un agente que puede prevenir o inhibir la degradación ósea para su uso en el tratamiento de metástasis ósea en un sujeto que se ha identificado que tiene una amplificación del gen c-MAF o un número de copias aumentado en comparación con un valor de referencia, en el que el agente que puede prevenir o inhibir la degradación ósea se selecciona del grupo que consiste en: un bisfosfonato, un inhibidor de RANKL, un inhibidor de PTH o PTHLH (incluyendo anticuerpos neutralizantes y péptidos), un análogo de PRG, ranelato de estroncio, un inhibidor de DKK-1, un inhibidor dual de MET y VEGFR2, un modulador del receptor de estrógenos, un inhibidor de EGFR, calcitonina, radio-223 y un inhibidor de cathepsina K.
 - 40
7. Un agente para su uso según la reivindicación 6, en el que el inhibidor de RANKL se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo específico de RANKL, un nanocuerpo específico de RANKL, osteoprotegerina, el bisfosfonato es ácido zoledrónico o clodronato; y el inhibidor dual de MET y VEGFR2 es cabozantinib.
 - 45
8. Un método de clasificación de un sujeto que padece cáncer de próstata en una cohorte, que comprende: a) determinar la amplificación o el número de copias de c-MAF en una muestra de tumor de próstata de dicho sujeto; b) comparar la amplificación o el número de copias de c-MAF en dicha muestra con una amplificación o un número de copias de c-MAF de referencia predeterminado; y c) clasificar dicho sujeto en una cohorte basándose en dicha amplificación o dicho número de copias de c-MAF en la muestra.
 - 50
9. Un método *in vitro* para tipificar una muestra de un sujeto que padece cáncer de próstata, comprendiendo el método:

en una muestra tumoral obtenida de dicho sujeto:

(i) cuantificar la amplificación o el número de copias de c-MAF en dicha muestra;

(ii) tipificar dicha muestra comparando la amplificación o el número de copias de c-MAF con una amplificación o un número de copias de c-MAF de referencia predeterminado;

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

10. Un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada para un sujeto que tiene cáncer de próstata con metástasis ósea que comprende determinar si el gen c-MAF está amplificado en una muestra tumoral de dicho sujeto en relación con un número de copias génicas de referencia, en el que una amplificación del gen c-MAF con respecto a dicho número de copias génicas de referencia indica que el sujeto es un candidato para recibir clodronato.

10