

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
19 de marzo de 2015 (19.03.2015) WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2015/036643 A2

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
G01N 33/574 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2014/070699
- (22) Fecha de presentación internacional:  
12 de septiembre de 2014 (12.09.2014)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P201331335  
13 de septiembre de 2013 (13.09.2013) ES
- (72) Inventor; e
- (71) Solicitante : SIERRA JIMÉNEZ, Angels [ES/ES]; Riera Villaret, 83-91, 5 I, E-08208 Sabadell (ES).
- (74) Mandatario: ARIAS SANZ, Juan; ABG Patentes, S.L., Avda. de Burgos, 16D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE,

KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Declaraciones según la Regla 4.17:**

- sobre el derecho del solicitante a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(iii))

**Publicada:**

- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: MARKER FOR PREDICTING METASTASIS OF BREAST CANCER

(54) Título : MARCADOR PARA PREDECIR METÁSTASIS DEL CANCER DE MAMA

(57) Abstract: The invention relates to an *in vitro* method for predicting metastasis in a subject diagnosed with breast cancer and treated with a taxane, with an *in vitro* method for the selection of patients with breast cancer that are at risk of developing metastasis following treatment with taxane, and an *in vitro* method for the design of a personalised therapy for a subject suffering from breast cancer and who is being treated with taxane, based on determining the level of GRP94 and/or FN14. The invention also relates to a composition comprising a taxane and a GRP94 inhibitor and/or an FN14 inhibitor, and to the use thereof in the treatment of cerebral metastasis.

(57) Resumen: La invención se relaciona con un método *in vitro* para predecir metástasis en un sujeto diagnosticado con cáncer de mama y tratado con un taxano, con un método *in vitro* para la selección de pacientes de cáncer de mama que presentan riesgo de desarrollar metástasis tras el tratamiento con taxano y con un método *in vitro* para el diseño de una terapia personalizada de un sujeto que sufre de cáncer de mama y que está siendo tratado con taxano basados en determinar el nivel de GRP94 y/o FN14. Asimismo, la invención se relaciona con una composición que comprende un taxano y un inhibidor de GRP94 y/o un inhibidor de FN14 y con su uso en el tratamiento de metástasis cerebral.



WO 2015/036643 A2

## MARCADOR PARA PREDECIR METÁSTASIS DEL CANCER DE MAMA

### DESCRIPCIÓN

#### 5 OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con métodos *in vitro* para predecir metástasis en un sujeto diagnosticado con cáncer de mama y tratado con un taxano o para seleccionar dicho sujeto o para diseñar una terapia personalizada para dicho sujeto.

10 Asimismo la invención se relaciona con composiciones y usos de las composiciones en tratamiento o prevención de metástasis cerebral.

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

- TX: El tumor primario no se puede evaluar. T0: No hay evidencia de tumor. Tis: Carcinoma in situ, no invasión. T1: El tumor es de 2 cm o menos. T2: El tumor es de más de 2 cm pero de menos de 5 cm. T3: El tumor es de más de 5 cm. T4: Tumor de cualquier tamaño que crece en la pared del pecho o piel, o cáncer de mama inflamatorio.
- NX: Los ganglios linfáticos cercanos no se pueden evaluar. N0: El cáncer no se ha extendido a los ganglios linfáticos regionales. N1: El cáncer se ha extendido a 1 a 3 ganglios linfáticos de la axila o a uno mamario interno. N2:

- El cáncer se ha extendido a 4 a 9 ganglios linfáticos de la axila o a múltiples ganglios mamarios internos. N3: Aplica uno de los siguientes: el cáncer se ha extendido a 10 ó más ganglios linfáticos de la axila, o el cáncer se ha extendido a los ganglios linfáticos bajo la clavícula, o el cáncer se ha extendido a los ganglios linfáticos por encima de la clavícula o el cáncer afecta a los ganglios linfáticos de la axila y se ha extendido a los ganglios linfáticos mamarios internos, o el cáncer afecta a 4 ó más ganglios linfáticos de la axila, y se encuentran cantidades mínimas de cáncer en los ganglios mamarios internos o en biopsia de ganglios linfáticos centinelas.
- 5
- 10 • MX: La presencia de extensión distante (metástasis) no se puede evaluar. M0: No hay extensión distante. M1: Se ha producido la extensión a órganos distantes, que no incluyen el ganglio linfático supraclavicular.

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

15

20

Estudios recientes han demostrado la expresión de genes implicados en la metástasis cerebral del cáncer de mama, concretamente HER2, EGFR, HPSE y Notch1 (Zhang L. et al., Science Translational Med 10 April 2013, Vol. 5, Issue 180, p. 180ra48) y EGFR, p63 y Ki67 (Shao MM. Et al., Med Mol Morphol. 2011 Mar;44(1):15-2).

25

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

30

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

35 En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para predecir

metástasis en un sujeto diagnosticado con cáncer de mama y tratado con un taxano que comprende

- i) determinar el nivel de expresión del gen GRP94 y/o el nivel de expresión del gen FN14 en una muestra dicho sujeto y
- 5 ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de referencia para cada gen

en donde un nivel de expresión de GRP94 y/o un nivel de FN14 incrementado con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de alto riesgo de desarrollar metástasis o en donde un nivel de expresión de GRP94 y/o un nivel de FN14  
10 disminuido con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de bajo riesgo de desarrollar metástasis.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la selección de pacientes de cáncer de mama que presentan riesgo de desarrollar  
15 metástasis tras el tratamiento con taxano que comprende

- i) determinar el nivel de expresión del gen GRP94 y/o el nivel de expresión del gen FN14 en una muestra dicho sujeto y
- ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de referencia para cada gen

20 en donde un el nivel de expresión de GRP94 y/o un nivel de FN14 disminuido con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de que dicho paciente tiene bajo riesgo de desarrollar metástasis tras el tratamiento con taxano.

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para el diseño  
25 de una terapia personalizada de un sujeto que sufre de cáncer de mama y que está siendo tratado con taxano que comprende

- i) determinar el nivel de expresión del gen GRP94 y/o el nivel de expresión del gen FN14 en una muestra dicho sujeto y
- ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de  
30 referencia para cada gen

en donde si el nivel de expresión de GRP94 y/o el nivel de FN14 está disminuido con respecto a dicho valor de referencia entonces dicho sujeto no es susceptible de ser tratado con un agente adecuado para el tratamiento de la metástasis cerebral o en donde si el nivel de expresión de GRP94 y/o el nivel de FN14 está incrementado con  
35 respecto a dicho valor de referencia entonces dicho sujeto es susceptible de recibir un

tratamiento con un agente adecuado para el tratamiento de la metástasis cerebral.

5 En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con el uso de un agente adecuado para el tratamiento de la metástasis cerebral para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de metástasis cerebral en un sujeto que presenta unos niveles de GRP94 incrementados respecto a un valor de referencia y que ha sido tratado con taxano.

10 En un quinto aspecto, la invención se relaciona con el uso de un taxano para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la metástasis cerebral en un sujeto que presenta unos niveles de GRP94 disminuidos respecto a un valor de referencia.

15 En un sexto aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende un taxano y un inhibidor de GRP94 y/o un inhibidor de FN14, en donde si el taxano es docetaxel entonces el inhibidor de FN14 no es el compuesto de fórmula (I) de la Tabla 2.

20 En un séptimo aspecto, la invención se relaciona con el uso de una composición de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de metástasis cerebral.

### DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25

**Figura 1.** Esquema de obtención de las células altamente metastáticas a cerebro por implantes consecutivos *in vivo/in vitro* con el que se obtienen tras cinco pases las células BRV5 y luego las BRV5CA1 cuando se inoculan en la carótida interna.

30 **Figura 2.** Citotoxicidad del Taxotere de las células de cáncer de mama que metastatizan en cerebro, BRV5CA1, y expresan la proteína grp94 (pool) o tienen silenciada su expresión (Clones 424-2 y 424-8). La respuesta al tratamiento de las células durante 72 h en presencia de Taxotere 1-10 ng/ml se expresa en porcentaje de supervivencia respecto al control.

35

**Figura 3.** Relación entre la expresión de GRP94 y la respuesta a Taxotere. Evolución del tamaño de los xenoinjertos intramamarios. El gráfico muestra las medianas de la respuesta variable (Volumen normalizado, dividido por el volumen inicial en día 0) a lo largo de tiempo para Taxotere (TXT) y no tratados (CTR).

5

**Figura 4.** (A) Gráfico correspondiente a las curvas ROC comparativas de los marcadores GRP94, FN14, GRP94+ FN14 y GRP94+FN14+HER2 en la predicción de riesgo de metástasis cerebral. Gráfico correspondiente a las curvas ROC de los marcadores GRP94+ FN14 (B) en la predicción de riesgo de metástasis cerebral.

10 Gráficos de curva ROC de FN14 (C) y GRP94 (D).

**Figura 5.** Gráficas mostrando la estratificación de los pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan (superior) o no FN14 (inferior) tratados o no con taxanos.

15 **Figura 6.** Expresión de FN14 en injertos de carcinoma de mama triple negativo en ratones inmunodeprimidos tratados o no con Lenaledomida (LND).

**Figura 7.** Efecto del tratamiento con el inhibidor de FN14 en el crecimiento de metástasis cerebrales.

20

### **EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

25 Los autores de la presente invención han identificado GRP94 y FN14 como genes relacionados con la metástasis cerebral de células de cáncer de mama. Así, GRP94 y FN14 de manera individual o en conjunto son útiles para predecir el riesgo de metástasis cerebral. Además, el tratamiento con taxotere de células de cáncer de mama que metastatizan a cerebro y que tienen silenciada la expresión de GRP94 reduce significativamente la supervivencia de dichas células.

30 Métodos pronósticos y de selección de pacientes de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para predecir metástasis en un sujeto diagnosticado con cáncer de mama y tratado con un taxano (primer método de la invención) que comprende

35 i) determinar el nivel de expresión del gen GRP94 y/o el nivel de

expresión del gen FN14 en una muestra dicho sujeto y

- ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de referencia para cada gen

5 en donde un nivel de expresión de GRP94 y/o un nivel de FN14 incrementado con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de alto riesgo de desarrollar metástasis o en donde un nivel de expresión de GRP94 y/o un nivel de FN14 disminuido con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de bajo riesgo de desarrollar metástasis.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la selección de pacientes de cáncer de mama que presentan riesgo de desarrollar metástasis tras el tratamiento con taxano (segundo método de la invención) que comprende

- i) determinar el nivel de expresión del gen GRP94 y/o el nivel de expresión del gen FN14 en una muestra dicho sujeto y

15 ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de referencia para cada gen

en donde un el nivel de expresión de GRP94 y/o un nivel de FN14 disminuido con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de que dicho paciente tiene bajo riesgo de desarrollar metástasis tras el tratamiento con taxano.

20

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para el diseño de una terapia personalizada de un sujeto que sufre de cáncer de mama y que está siendo tratado con taxano (tercer método de la invención) que comprende

- i) determinar el nivel de expresión del gen GRP94 y/o el nivel de expresión del gen FN14 en una muestra dicho sujeto y

25

- ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de referencia para cada gen

30 en donde si el nivel de expresión de GRP94 y/o el nivel de FN14 está disminuido con respecto a dicho valor de referencia entonces dicho sujeto no es susceptible de ser tratado con un agente adecuado para el tratamiento de la metástasis cerebral o en donde si el nivel de expresión de GRP94 y/o el nivel de FN14 está incrementado con respecto a dicho valor de referencia entonces dicho sujeto es susceptible de recibir un tratamiento con un agente adecuado para el tratamiento de la metástasis cerebral.

35 En el contexto de la presente invención, se entiende por "metástasis" a la propagación

de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició. Ocurre generalmente por vía sanguínea o linfática. Cuando las células cancerosas se diseminan y forman un tumor nuevo, éste se llama tumor secundario, o tumor metastásico. Las células del cáncer que forman el tumor secundario son como las del tumor original. Por ejemplo, si un cáncer de mama se disemina (metastatiza) al cerebro, el tumor secundario está formado de células malignas del cáncer de mama. En una realización particular del primer y segundo método de la invención, la metástasis es metástasis cerebral, es decir cáncer de mama que se ha diseminado (metastizado) al cerebro.

10

"Predecir" tal y como se usa en la presente invención se refiere a la determinación de la probabilidad de que el sujeto que sufre de cáncer de mama desarrolle metástasis a órganos distantes.

15 Un experto en la materia comprenderá que la predicción de la tendencia de un tumor primario de mama a metastatizar no necesita ser correcta para todos los sujetos que van a ser identificados (es decir, el 100% de los sujetos). No obstante, el término requiere permitir la identificación de una parte significativa de los sujetos (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohorte). Si una parte es estadísticamente significativa se puede determinar de una manera sencilla por la persona experta en la técnica utilizando diferentes herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de los intervalos de confianza, la determinación de los valores p, ensayo T de Student, Mann-Whitney, etc. Se proporcionan detalles en Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley and Sons, New York 1983.

20 Los intervalos de confianza preferidos son al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos el 99%. Los valores p son, preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 y 0,0001. Más preferiblemente, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% de los sujetos de una población pueden ser adecuadamente identificados por el método de la presente invención.

30

El término "sujeto" o "paciente", como se usa aquí, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no está restringido a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, o roedores.

35 Preferiblemente, el sujeto es un humano hombre o mujer de cualquier edad o raza y



más preferiblemente el sujeto es una mujer.

De acuerdo con los métodos de la invención, el sujeto sufre cáncer de mama. El experto en la materia conoce distintos ensayos para conocer si un sujeto padece  
5 cáncer de mama. Por ejemplo es posible utilizar técnicas de diagnóstico por imagen, entre ellas mamografía, ecografía mamaria, resonancia magnética o Imagen de Resonancia Magnética (I.R.M.) o resonancia, tomografía por emisión de positrones (T.E.P. o P.E.T.). Alternativamente el diagnóstico puede obtenerse mediante biopsia.

10 Por "cáncer de mama" tal y como se usa en la presente invención se refiere al crecimiento desenfrenado de células malignas en el tejido mamario. Los tipos de cáncer de mama se agrupan principalmente en 5 grupos, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobular *in situ*, lobular infiltrante y carcinoma inflamatorio. El carcinoma ductal *in situ* se encuadra en los conductos mamarios o  
15 galactóforos. Si no se trata, puede extenderse más allá de los conductos mamarios y originar metástasis. El carcinoma ductal invasor, o infiltrante invade el tejido adiposo del seno, desde uno de los conductos. El carcinoma invasor es el más frecuente de los cánceres de mama; supone aproximadamente el 80 por ciento de todos los que se producen. El carcinoma lobular *in situ* se origina en las glándulas mamarias (o lóbulos)  
20 y, aunque no es un verdadero cáncer, aumenta el riesgo de que la mujer pueda desarrollar un cántumor en el futuro. Una vez que es detectado, es importante que la mujer se realice una mamografía de control al año y varios exámenes clínicos para vigilar el posible desarrollo de cáncer. El carcinoma lobular invasor sigue el mismo proceso de filtración que el carcinoma ductal invasor hacia el tejido adiposo, pero  
25 desde los lobulillos. El carcinoma inflamatorio es poco frecuente pero bastante agresivo. Se denomina inflamatorio porque las células cancerosas bloquean los vasos linfáticos y esto se manifiesta en la piel, que adquiere una apariencia gruesa y ahuecada, similar a la de una cáscara de naranja. También se entiende como cáncer de mama al cáncer de mama mucinoso o coloide o el cáncer de Paget.

30

Por "taxano" tal y como se usa en la presente invención, se entiende un medicamento antineoplásico que impide el crecimiento celular al impedir la división de las células. También se les denomina antimicrotúbulo, antimitótico e inhibidor mitótico. Los taxanos son terpenos producidos por plantas del género *Taxus* como el Tejo de ahí su  
35 nombre genérico. Fueron identificados por primera vez en fuentes naturales, pero

algunos de ellos han sido sintetizados artificialmente. Taxanos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, paclitaxel (Taxol(R)), docetaxel (Taxotere(R)), larotaxel, cabazitaxel, nab-paclitaxel (Abraxane(R)), paclitaxel dextrina, paclitaxel xilosa, derivados sintéticos o semi-sintéticos del taxano, derivados de taxano  
5 tales como IDN 5390, GRN1005, los derivados de taxano descritos en EP 2330100A1, y los derivados de taxano descritos o mencionados en Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol. 76 (2012), No. 2 pp. 349-352. Son taxanos preferidos el paclitaxel y el docetaxel.

10 Por "paclitaxel" o taxol® tal y como se usa en la presente invención, se refiere al compuesto ,11-Methano-5H-cyclodeca[3,4]benz[1,2-b]oxete benzenepropanoic acid deriv., con número CAS 33069-62-4.

Por "docetaxel" también denominado Taxotere®, según se usa en la presente  
15 invención se refiere a N-debenzoyl-N-tert-butoxycarbonyl-10-deacetyl taxol con número CAS 114977-28-5.

Los métodos de la invención comprenden en una primera etapa determinar el nivel/los  
niveles de expresión del gen GRP94 y/o del gen FN14 en una muestra de un sujeto.

20 Por "GRP94" también denominada endoplasmina, HSP90B1, gp96 o ERP99, tal y como se usa en la presente invención se refiere a un gen que codifica a una chaperona del retículo endoplásmico con actividad ATPasa que funciona en el procesamiento y transporte de proteínas secretadas. La proteína presentan tres  
25 dominios importantes: uno para enlace al ATP, un dominio proteico y un dominio de dimerización. El gen GFRP94 codifica en humanos la proteína que corresponde a la secuencia P14625 de la base de datos Uniprot a fecha 17 de abril de 2013.

Por "FN14", también denominada TNFRSF12A, CD266 o TWEAKR, tal y como se usa  
30 en la presente invención se refiere a un gen que codifica al factor de crecimiento de fibroblastos inducible de 14 kDa, miembro 12 A de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral. FN14 codifica para el receptor de TWEAK y juntos desempeña un papel en la muerte celular e inflamación. El gen FN14 codifica en  
humanos a la proteína que corresponde a la secuencia Q9NP84 de la base de datos  
35 Uniprot a fecha 6 de junio de 2013.

Por "muestra" según se emplea en la presente invención se entiende al material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para determinar el nivel de expresión del gen GRP94 y/o del gen FN14. La muestra puede aislarse de cualquier tejido biológico adecuado o líquido, tales como, por ejemplo, tejido del tumor, sangre, plasma sanguíneo, suero, orina o líquido cefalorraquídeo. En una realización particular de los métodos de la invención, la muestra es una muestra de tejido tumoral.

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

El término "nivel de expresión" de un gen como se usa aquí se refiere a la cantidad medible de producto del gen en una muestra del sujeto, en el que el producto del gen  
25 puede ser un producto de la transcripción o un producto de la traducción. En consecuencia, el nivel de expresión puede corresponder a un producto de ácido nucleico del gen tal como ARNm o ADNc o un producto polipéptido del gen. El nivel de expresión se deriva de la muestra de un sujeto y/o una muestra o muestras de referencia, y puede ser detectado de novo o corresponder a una determinación  
30 anterior.

Como entiende el experto en la materia, la cuantificación del nivel de expresión del gen GRP94 y/o del gen FN14 puede realizarse mediante la cuantificación de los niveles de expresión de la proteínas codificada por dichos genes, es decir, en el caso  
35 de GRP94 la proteína endoplasmica o cualquier variante funcionalmente equivalente

de la proteína endoplasmica o bien mediante la determinación de la actividad de dicha proteína y en el caso de FN14, la proteína fn14 o cualquier variante funcionalmente equivalente de la proteína fn14 o bien mediante la determinación de la actividad de dicha proteína.

5

En el contexto de la presente invención, se entiende por “variante funcionalmente equivalente de una proteína” a (i) variantes de la proteína en las que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado), en donde tal residuo de aminoácido sustituido puede ser o puede no ser uno codificado por el código genético, o (ii) variantes que comprenden una inserción o una delección de uno o más aminoácidos, y que desempeña la misma función que la proteína es decir, en el caso de grp94 actuar como chaperona ayudando al plegamiento de proteínas recién formadas y en el caso de fn14 actuar como receptor de Tweak.

15

Variantes de la proteína grp94 pueden identificarse usando métodos basados en la actividad ATPasa de grp4 tal y como el descrito en Dollins DE et al, Mol Cell. 2007 October 12; 28(1): 41–56, o métodos basados en el análisis de la función chaperona como los descritos en Ramsey, A. J., Russell, L. C., Whitt, S. R., and Chinkers, M. (2000) J. Biol. Chem. 275, 17857–17862 y Young, J. C., Schneider, C., and Hartl, F. U. (1997) *FEBS Lett.* 418, 139–143.

20

Variantes de la proteína fn14 pueden identificarse por ejemplo usando métodos basados en la capacidad de unión a Tweak, o métodos basados en la capacidad de activación de NF-kappaB tal y como se describe en Brown SA. et al., Biochem J. 2003 Apr 15;371(Pt 2):395-403.

25

Las variantes de grp94 o las variantes de fn14 según la invención tienen preferentemente una identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de grp94 o con la secuencia de fn14, respectivamente, de al menos, el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. El grado de identidad entre las variantes y las secuencias específicas de proteína grp94 o fn14 definidas anteriormente se determina usando algoritmos y procedimientos informáticos que son

35

ampliamente conocidos para los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP [BLAST Manual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

5

El nivel de expresión de la proteína grp94 y/o de la proteína fn14 puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de grp94 o fn14 pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el  
10 empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a grp94 (o a fragmentos de la misma que contenga un determinante antigénico) o fn14, respectivamente, y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos  
15 quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo  
20 inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras  
25 maneras para detectar y cuantificar las proteínas, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc. Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe se une a la proteína grp94 con alta afinidad para detectar la cantidad de la misma. Sin embargo, se prefiere el uso de un anticuerpo, por ejemplo, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas  
30 o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados. En el mercado, existen anticuerpos comerciales contra la proteína grp94 que pueden emplearse en el contexto de la presente invención. Son múltiples las casas comerciales que ofrecen anticuerpos anti- GRP94, como Novus Biologicals, Thermo Scientific, Pierce  
35 Antibodies, GeneTex y Abcam entre otros.

En una realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína grp94 y/o fn14 se realiza mediante western blot, ELISA o un array de proteínas.

- 5 Por otro lado, la cuantificación del nivel de expresión del gen GRP94 y/o del gen FN14 también puede realizarse mediante la cuantificación de los niveles de expresión de un gen se puede determinar midiendo los niveles del ARN mensajero de dicho gen o de la proteína codificada por dicho gen.
- 10 Para este fin, la muestra biológica se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o la célula, liberando los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para preparar los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se extraen mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia y disponibles comercialmente (Sambroock, J., et al., "Molecular cloning: a Laboratory
- 15 Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.)

Así, la cuantificación del nivel de expresión del gen GRP94 y/o del gen FN14 puede realizarse a partir del ARN resultante de la transcripción de dicho gen (ARN mensajero o ARNm) o, alternativamente, a partir del ADN complementario (ADNc) de dicho gen.

- 20 Por tanto, en una realización particular de los métodos de la invención, la cuantificación de los niveles de expresión del gen GRP94 comprende la cuantificación del ARN mensajero del gen GRP94, o un fragmento de dicho ARNm, ADN complementario del gen GRP94, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.
- 25 Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm codificados por el gen GRP94 y/o FN14 o de su ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm codificados por dicho gen pueden ser cuantificados mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la
- 30 amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante Southern blot y empleo de sondas apropiadas, northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm del gen de interés (GRP94 y/o FN14) o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-LCR, hibridación, microarrays, etc., preferentemente, mediante
- 35 PCR cuantitativa a tiempo real usando un marcador apropiado. Análogamente, los

niveles del ADNc correspondiente a dicho ARNm codificado por el gen GRP94y/o FN14 también pueden ser cuantificados mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente ADNc mediante transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho ADNc. Métodos convencionales de cuantificar los niveles de expresión pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook y cols., 2001. (citado ad supra).

Estos métodos son conocidos y una persona experta en la materia estará familiarizada con las normalizaciones necesarias para cada técnica. Por ejemplo, las medidas de expresión generadas utilizando la PCR multiplex deben ser normalizadas mediante la comparación de la expresión del gen que se mide con los llamados genes "housekeeping", la expresión de los cuales debe ser constante en todas las muestras, proporcionando así una expresión basal para comparar, o con otros genes control cuya expresión se conoce que es modulada con el cáncer.

En una realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión del gen GRP94 y/o FN14 se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o un array de ADN o ARN o mediante técnicas de hibridación de nucleótidos.

La segunda etapa de los métodos de la invención comprende comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de referencia.

"Valor de referencia", como se usa aquí, se refiere a un valor obtenido en el laboratorio y utilizado como referencia para los valores o datos obtenidos mediante exámenes de laboratorio de los pacientes o muestras recogidas de pacientes. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior y/o inferior, un intervalo de valores, un valor medio, un valor de la mediana, un valor medio, o un valor en comparación a un control determinado o valor de referencia. El valor de referencia puede estar basado en un valor de la muestra individual, como por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que está siendo probada, pero en un momento anterior. El valor de referencia puede estar basado en un gran número de muestras, como los valores de la población de sujetos

del mismo grupo de edad, o puede estar basado en un conjunto de muestras, incluyendo o excluyendo la muestra a ensayar.

En una realización, el valor o valores de referencia tal como aquí se entiende puede  
5 representar cantidades absolutas. En otra realización, el nivel de expresión se puede determinar directamente en relación con el valor de referencia (por ejemplo, en términos de aumento o disminución, o aumento o disminución de número de veces).

En una realización preferida, el valor de referencia de GRP94 es el nivel de expresión  
10 del gen GRP94 en una muestra control o muestra de referencia y el valor de referencia de FN14 es el nivel de expresión del gen FN14 en una muestra control o muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor a analizar, la naturaleza exacta del control o muestra de referencia puede variar.

15 Así, en el caso de que se vaya a evaluar un pronóstico, entonces la muestra de referencia es una muestra de un sujeto con cáncer de mama que no ha hecho metástasis o que se corresponde con el valor de la mediana del nivel de expresión génica de GRP94 o FN14 medida en una colección de tejido tumoral de muestras de  
20 biopsia de pacientes con cáncer de mama que no han hecho metástasis.

Dicha muestra de referencia se obtiene típicamente combinando cantidades iguales de  
muestras de una población de sujetos. En general, las muestras de referencia típicas se obtendrán de sujetos que están clínicamente bien documentados y en los que la ausencia de metástasis se encuentra bien caracterizada. En tales muestras, las  
25 concentraciones normales (de referencia) del biomarcador (gen GRP94 y/o FN14) se pueden determinar, por ejemplo proporcionando la concentración media sobre la población de referencia. Al determinar la concentración de referencia del marcador se toman en cuenta varias consideraciones. Entre tales consideraciones están la edad, peso, sexo, estado físico general del paciente y similares. Por ejemplo, se toman como  
30 grupo de referencia cantidades iguales de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 a preferiblemente más de 1000 sujetos, preferiblemente clasificados según las consideraciones anteriores, por ejemplo de varias categorías de edad. La colección de muestras de las que deriva el nivel de referencia estará preferiblemente constituida por sujetos que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente objeto de estudio.

35



En una forma de realización particular, los valores de referencia para expresión “incrementada” o “disminuida” de la expresión de los genes se determinan calculando los percentiles por medios convencionales que implica ensayar en una o varias muestras aisladas de sujetos en los que la enfermedad se encuentra bien documentada, por alguno de los métodos mencionados anteriormente, los niveles de expresión de GRP94 y/o de FN14. Los niveles “reducidos” de GRP94 y/o FN14 se pueden entonces asignar, preferiblemente, a muestras en donde los niveles de expresión de GRP94 y/o FN14 son iguales a o inferiores al percentil 50 en la población normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de expresión iguales a o inferiores del percentil 60 en la población normal, iguales a o inferiores al percentil 70 en la población normal, iguales a o inferiores al percentil 80 en la población normal, iguales a o inferiores al percentil 90 en la población normal, e iguales a o inferiores al percentil 95 en la población normal. Los niveles de expresión “incrementados” del gen GRP94 y/o FN14 se pueden entonces asignar, preferiblemente, a muestras en donde los niveles de expresión del gen GRP94y/o FN14 son iguales a o superan el percentil 50 en la población normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de expresión iguales a o en exceso al percentil 60 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 70 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 80 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 90 en la población normal, e iguales a o en exceso al percentil 95 en la población normal.

Tras la realización de las etapas i) y ii) del primer método de la invención, si el nivel de expresión de dicho gen está incrementado con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de alto riesgo de desarrollar metástasis o en donde si el nivel de expresión de dicho gen está disminuido con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de bajo riesgo de desarrollar metástasis.

En la presente invención se entiende por “niveles de expresión incrementados” cuando el nivel de expresión de un gen (GRP94 o FN14) es superior al valor de referencia. En particular, se puede considerar que una muestra presenta niveles altos de expresión de GRP94 o FN14 cuando los niveles de expresión son en la muestra del sujeto al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto al valor de referencia de GRP94 o FN14 respectivamente.

En la presente invención se entiende por “niveles de expresión disminuidos” cuando el nivel de expresión de un gen (GRP94 o FN14) es inferior al valor de referencia. En particular, se puede considerar que una muestra presenta niveles bajos de expresión de GRP94 o FN14 cuando los niveles de expresión en la muestra del sujeto se han  
5 reducido al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o 100 veces con respecto al valor de referencia de GRP94 o FN14 respectivamente.

Se entiende por “alto riesgo” a la situación donde el sujeto presenta al menos un 20%,  
10 al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 100% de probabilidades de desarrollar metástasis a lo largo del tiempo.

Se entiende por “bajo riesgo” a la situación donde el sujeto presenta menos de un  
15 20%, menos de un 15%, menos de un 10%, menos de un 5% de probabilidades de desarrollar metástasis a lo largo del tiempo.

Tras la realización de las etapas i) y ii) del segundo método de la invención, si el nivel de expresión de GRP94 y/o FN14 está disminuido con respecto a dicho valor de  
20 referencia es indicativo de que dicho paciente tiene bajo riesgo de desarrollar metástasis tras el tratamiento con taxano.

Tras la realización de las etapas i) y ii) del tercer método de la invención si el nivel de expresión de GRP94 y/o FN14 está disminuido con respecto a dicho valor de  
25 referencia entonces dicho sujeto no se trata con un agente adecuado para el tratamiento de la metástasis cerebral o si el nivel de expresión de dicho gen está incrementado con respecto a dicho valor de referencia entonces dicho sujeto es susceptible de recibir un tratamiento con un agente adecuado para el tratamiento de la metástasis cerebral.

30

Por “agentes adecuados para el tratamiento de la metástasis cerebral”, según la presente invención, se entiende un compuesto capaz de reducir o frenar el desarrollo de metástasis en el cerebro. Agentes adecuados para el tratamiento de la metástasis cerebral para su uso según la presente invención son entre otros un agente  
35 antiangiogénico, un inhibidor de hsp90, un inhibidor del factor de crecimiento

epidérmico, un inhibidor de HDAC, un inhibidor de PARP, un inhibidor de BRAF o un inhibidor de tirosina quinasa (TK). Como entenderá el experto en la materia, los agentes adecuados para el tratamiento de la metástasis cerebral según la presente invención, incluyen no sólo los compuestos citados a continuación sino también  
5 derivados de dichos compuestos, así como moléculas que actúan interrumpiendo la ruta de señalización de VEGF, HSP90, EGF, HDAC, PARP, BRAF y TK.

Por “agente antiangiogénico”, tal y como se usa en la presente invención, se entiende un agente químico o biológico que inhibe o reduce la formación de nuevos vasos  
10 sanguíneos a partir de vasos preexistentes (angiogénesis).

Para saber si un compuesto es un agente antiangiogénico es posible emplear cualquier ensayo conocido en el estado de la técnica para detectar angiogénesis, tal y como los descritos en Auerbachj R. et al, Clin Chem. 2003 Jan;49(1):32-40 o ensayos  
15 comerciales como Angiogenesis Assay de Cell Biolabs, Inc., de manera que si el compuesto a ensayar inhibe angiogénesis, dicho compuesto es un agente antiangiogénico útil en la presente invención.

En una realización particular, el agente antiangiogénico se selecciona del grupo  
20 formado por Bevacizumab, Sunitinib, endostatina, Sorafenib y Cilengitide.

Por “Bevacizumab” tal y como se usa en la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), inhibiendo la unión de éste a sus receptores Flt1 y KDR situados en  
25 las superficies de las células endoteliales.

Por “Sunitinib,” tal y como se usa en la presente invención se refiere al compuesto *N*-[2-(diethylamino)ethyl]-5-[(*Z*)-(5-fluoro-1,2- dihydro-2-oxo-3*H*-indol-3-ylidene)methyl]-2,4- dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxamide con numero CAS 341031-54-7. Sutinib inhibe  
30 las señales celulares por unión a múltiples receptores de tirosina quinasa (RTKs).

Por “endostatina” o COL18A1 tal y como se usa en la presente invención se refiere a una proteína derivada de una forma del colágeno y que corresponde a la proteína con número de acceso P39060 en la base de datos Uniprot el 17 de abril de 2013.

Por "sorafenib" tal y como se usa en la presente invención se refiere al compuesto 4-[4-({[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]carbamoyl}.amino)phenoxy]-N-methylpyridine-2-carboxamide con número CAS 284461-73-0

5 Por "Cilengitide", tal y como se usa en la presente invención se refiere al compuesto 2-[(2S,5R,8S,11S)-5-benzyl-11-{3-[(diaminomethylidene)amino]propyl}-7-methyl-3,6,9,12,15-pentaoxo-8-(propan-2-yl)-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecan-2-yl]acetic acid con número CAS 188968-51-6.

10 Por "inhibidor de HSP90" tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un compuesto capaz de disminuir los niveles de proteína o la actividad de una HSP90, que en humanos la isoforma HSP90B1 corresponde a la proteína con número de acceso P14625 en la base de datos Uniprot el 17 de abril de 2013. HSP90 es una proteína chaperona que permite el correcto plegamiento de otras proteínas y las  
15 estabiliza frente a stress térmico y ayuda en la degradación de proteínas. Existen diversas isoformas de HSP90, incluyéndose a modo de ejemplo ilustrativo no limitativo la familia HSP90A, HSP90B y TRAP.

Para saber si un compuesto es un inhibidor de HSP90 es posible emplear cualquier  
20 ensayo conocido en el estado de la técnica para analizar la actividad de HSP90 tal y como los ensayos descritos en Aherne W. et al., Methods in Molecular Medicine | Volume: 85 , Mar-26-2003, pages 149-161 o kits comerciales como Hsp90 $\alpha$  Assay Kit de BPS Bioscience.

25 Inhibidores de HSP90 útiles en la presente invención son los compuestos descritos en la Tabla 1 más adelante. En una realización particular, el inhibidor es 17-(Dimethylaminoethylamino)-17-Demethoxygeldanamycin.

"Inhibidor del factor de crecimiento epidérmico", tal y como se usa en la presente  
30 invención, se refiere a un compuesto capaz de inhibir la actividad del factor de crecimiento epidérmico (EGF), es decir el crecimiento celular, la proliferación y diferenciación por su unión al receptor EGFR.

Para saber si un compuesto es un inhibidor de factor de crecimiento epidérmico es  
35 posible emplear cualquier ensayo conocido en el estado de la técnica para analizar la

proliferación celular en presencia de EGF, tal y como el kit comercial Cell Proliferation Assay Kits de Life technologies, de manera que si el compuesto a ensayar inhibe la proliferación celular en presencia de EGF, dicho compuesto es un inhibidor de EGF.

5 “trastuzumab”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2), con número CAS 180288-69-1.

10 “Erlotinib”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al compuesto *N*-(3-ethynylphenyl)-6,7-bis(2-methoxyethoxy) quinazolin-4-amine con número CAS 183321-74-6.

15 “Lapatinib”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al compuesto *N*-[3-chloro-4-[(3-fluorophenyl)methoxy]phenyl]-6-[5-[(2-methylsulfonyl)ethylamino)methyl]-2-furyl] quinazolin-4-amine con número CAS 231277-92-2. Dicho compuesto también actúa como inhibidor de tirosina quinasas.

20 “HKI-272” o Neratinib, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al compuesto (2*E*)-*N*-[4-[[3-chloro-4-[(pyridin-2-yl)methoxy]phenyl]amino]-3-cyano-7-ethoxyquinolin-6-yl]-4-(dimethylamino)but-2-enamide con número CAS 698387-09-6. Dicho compuesto también actúa como inhibidor de tirosina quinasas.

25 “Afatinib” o BIBW 2992, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al compuesto *N*-[4-[(3-Chloro-4-fluorophenyl)amino]-7-[[3*S*]-tetrahydro-3-furanyl]oxy]-6-quinazolinyl]-4(dimethylamino)-2-butenamide con número CAS 850140-72-6

30 “gefitinib”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al compuesto *N*-(3-chloro-4-fluoro-phenyl)-7-methoxy- 6-(3-morpholin-4-ylpropoxy)quinazolin-4-amine con numero CAS 184475-35-2.

“Icotinib” o BPI-2009H, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al compuesto (1,4,7,10)Tetraoxacyclododecino(2,3-*g*)quinazolin-4-amine con número CAS 610798-31-7.

35 Por “inhibidor de HDAC”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a

un compuesto que inhibe la actividad de histona deacetilasa (HDAC), enzima implicada en la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas y que en humanos la isoforma HDAC1 corresponde a la proteína con número de acceso Q13547 en la base de datos Uniprot el 17 de abril de 2013. Los inhibidores  
5 de HDAC también tienen efectos en proteínas no histonas que están relacionadas con el proceso de acetilación, entre ellas HSP90.

Para saber si un compuesto es un inhibidor de HDAC es posible emplear cualquier ensayo conocido en el estado de la técnica para analizar la actividad histona  
10 deacetilasa, tal y como el kit comercial EpiQuick HDAC Activity/Inhibition Assay Kit de Epigentek, de manera que si el compuesto a ensayar inhibe la actividad histona deacetilasa, dicho compuesto es un inhibidor de HDAC.

En una realización particular de la presente invención el inhibidor de HDAC se  
15 selecciona del grupo formado por vorinostat y panobinostat.

“Vorinostat”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al compuesto *N*-hydroxy-*N'*-phenyl-octanediamide con número CAS 149647-78-9.

20 “Panobinostat” o LBH-589, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al compuesto (2*E*)-*N*-hydroxy-3-[4-({[2-(2-methyl-1*H*-indol-3-yl)ethyl] amino} methyl) phenyl]acrylamide con número CAS 404950-80-7.

Por “inhibidor de PARP”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un  
25 compuesto que inhibe la actividad de la poli ADP-ribosa-polimerasa (PARP), enzima implicada en la reparación del ADN y en la muerte celular programada y que en humanos PARP1 corresponde a la secuencia con número de acceso P09874 en la base de datos Uniprot el 17 de abril de 2013.

30 Para saber si un compuesto es un inhibidor de PARP se puede emplear cualquier método conocido en el estado de la técnica para analizar la reparación del ADN y la apoptosis tal y como el kit comercial Universal PARP Assay Kits de Trevigen®

En una realización particular de la presente invención el inhibidor de PARP se  
35 selecciona del grupo formado por Iniparib, olaparib y veliparib.

Por "Iniparib" o BSI-201, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a 4-iodo-3-nitrobenzamide con número CAS 16003-66-7.

- 5 Por "olaparib" o AZD-2281, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a 4-[(3-[(4-cyclopropylcarbonyl)piperazin-4-yl]carbonyl)-4-fluorophenyl]methyl (2H) phthalazin -1-one con número CAS 763113-22-0.

- Por "veliparib" o ABT-888, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere al  
10 compuesto 2-((*R*)-2-Methylpyrrolidin-2-yl)-1*H*-benzimidazole-4-carboxamide con número CAS 912444-00-9.

- Por "inhibidor de BRAF", tal y como se usa en la presente invención, se entiende un compuesto que inhibe la actividad de BARF, que en humanos codifica para la proteína  
15 con número de acceso P15056 en la base de datos de Uniprot el 17 de abril de 2013. La proteína es miembro de la familia de Raf quinasas y juega un papel en la regulación de la vías de señalización MAP quinasas /ERKs que afectan a la división celular, diferenciación y secreción.

- 20 Para saber si un compuesto es un inhibidor de BRAF, se puede emplear cualquier método conocido en el estado de la técnica tal y como el kit comercial B-Raf kinase assay kit de Millipore basados en la detección de la fosforilación de MEK1.

- En una realización particular el inhibidor de BRAF es vemurafenib. "Vemurafenib" tal y  
25 como se usa en la presente invención se refiere al compuesto c N-(3-(5-(4-chlorophenyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine-3-carbonyl)-2,4-difluorophenyl) propane-1-sulfonamide con número CAS 1029872-54-5.

- Por "inhibidor de tirosina quinasa", tal y como se usa en la presente invención, se  
30 refiere a un compuesto que la actividad de una proteína tirosin quinasa, enzima capaz de transferir un grupo fosfato a un residuo de tirosina de una proteína.

- Para saber si un compuesto es un inhibidor de una tirosina quinasas, se puede emplear cualquier método conocido en el estado de la técnica tal como los descritos  
35 en Hawes BE. et al., Curr Protoc Pharmacol. 2001 May;Chapter 3:Unit3.5. o el kit

comercial Tyrosine Kinase Assay Kit, Colorimetric Detection de Merck Millipore.

En una realización particular el inhibidor de tirosina quinasa se selecciona del grupo formado por sunitinib, sorafenib y pazopanib.

5

“sunitinib” SU11248, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al compuesto N-[2-(diethylamino)ethyl]-5-[(Z)-(5-fluoro-1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidene)methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxamide con número CAS 341031-54-7.

10 “sorafenib”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al compuesto 4-[4-({[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]carbonyl}amino)phenoxy]-N-methylpyridine-2-carboxamide con número CAS 284461-73-0.

“Pazopanib”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al compuesto 5-[[4-  
15 [(2,3-Dimethyl-2H-indazol-6-yl) methylamino]- 2-pyrimidinyl] amino]-2-methylbenzolsulfonamide con número CAS 444731-52-6.

#### Usos médicos y composiciones de la invención

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un agente adecuado para el tratamiento de la metástasis cerebral para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de metástasis cerebral en un sujeto que presenta unos niveles de GRP94 incrementados respecto a un valor de referencia y que ha sido tratado con taxano.

25

Alternativamente, la invención se relaciona con un agente adecuado para el tratamiento de la metástasis cerebral para el tratamiento o prevención de metástasis cerebral en un sujeto que presenta unos niveles de GRP94 incrementados respecto a un valor de referencia y que ha sido tratado con taxano

30

En otro aspecto la invención se relaciona con el uso de un taxano para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la metástasis cerebral en un sujeto que presenta unos niveles de GRP94 disminuidos respecto a un valor de referencia.

35 Alternativamente, la invención se relaciona con un taxano para su uso en el



tratamiento de la metástasis cerebral en un sujeto que presenta unos niveles de GRP94 disminuidos respecto a un valor de referencia.

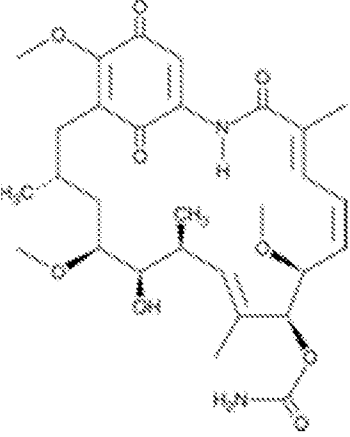
El modo en que un experto en la materia puede determinar si un sujeto presenta unos niveles de GRP94 incrementados o disminuidos respecto a un valor de referencia se ha descrito anteriormente en relación con los métodos de la invención.

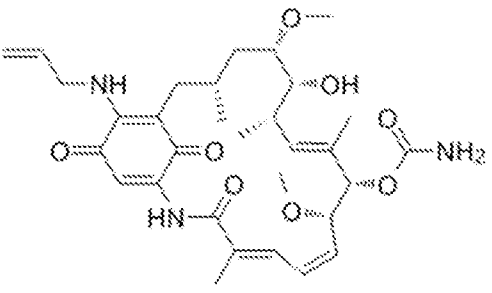
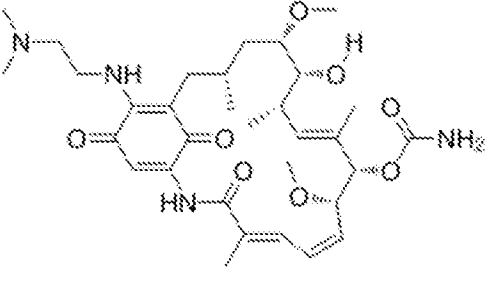
El término "tratamiento", tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier tipo de terapia, que tenga como objetivo la terminación, la prevención, la mejora o la reducción de la susceptibilidad a padecer una condición clínica, como se describe aquí. En una forma de realización preferida, el término tratamiento se refiere al tratamiento profiláctico (es decir, una terapia para reducir la susceptibilidad a padecer una condición clínica) de un trastorno o condición. Así, "tratamiento", "tratar", y sus términos equivalentes se refieren a la obtención de un efecto deseado farmacológica o fisiológicamente, que cubre cualquier tratamiento de una afección patológica o trastorno en un mamífero, incluyendo el ser humano. El efecto puede ser profiláctico en términos de proporcionar prevención total o parcial de un trastorno y/o efecto adverso atribuible al mismo. Es decir, "tratamiento" incluye (1) prevenir que la enfermedad ocurra o se repita en un sujeto, (2) inhibir la enfermedad, por ejemplo deteniendo su desarrollo, (3) interrumpir o finalizar el desorden o por lo menos los síntomas asociados al mismo, por lo que el paciente ya no sufriría la enfermedad o sus síntomas, por ejemplo provocar la regresión de la enfermedad o sus síntomas mediante la restauración o reparación de una función perdida, ausente o defectuosa, o estimular un proceso ineficiente, o (4), aminorar, aliviar o mejorar la enfermedad, o los síntomas asociados a la misma, donde aminorar se utiliza en un sentido amplio para referirse a, al menos, una reducción en la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor, o deficiencia inmune.

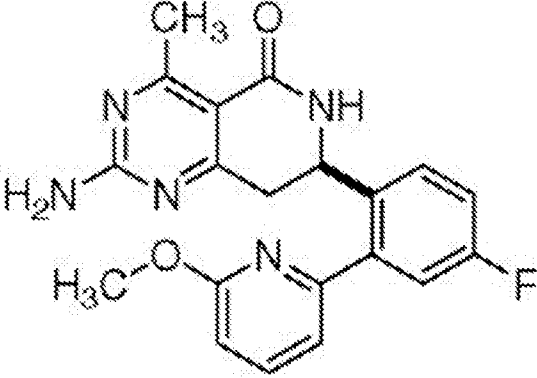
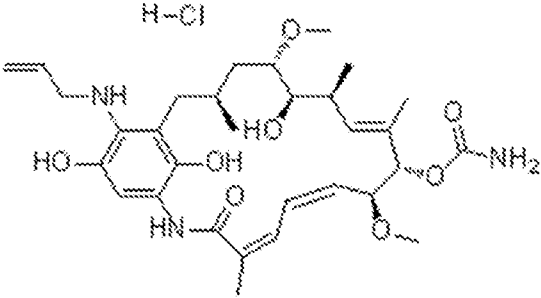
Los términos "taxano" y "agente adecuado para el tratamiento de metástasis" incluyendo los distintos agentes han sido descrito anteriormente en relación con los métodos de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición, composición de la invención, que comprende un taxano y un inhibidor de GRP94 y/o un inhibidor de FN14, en donde si el taxano es docetaxel entonces el inhibidor de FN14 no es el compuesto de fórmula (I) de la Tabla 2.

En una realización particular el inhibidor de GRP94 se seleccionada de la Tabla 1.

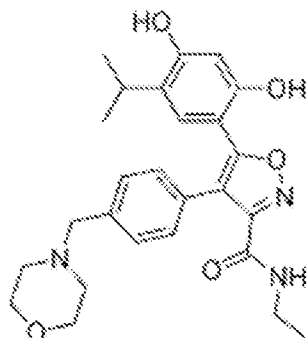
TABLA 1: INHIBIDORES DE GRP94 ADECUADOS PARA SU USO EN LA PRESENTE INVENCION	
I	<p>Geldanamicina, benzoquinone ansamycin según la fórmula</p>  <p>tal y como se describe en Lawson B et al., J Cell Physiol. 1998 Feb;174(2):170-8.</p>

II	<p>Análogos de geldanamicina que contienen una derivatización en la posición 17 tales como</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 17-AAG (17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin), tanespimycin según la fórmula</li></ul>  <ul style="list-style-type: none"><li>- 17-DMAG, alvespimycin, (17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin) según la fórmula</li></ul> 
III	<p>“Compuesto 2” tal y como se describe en Duerfeldt AS et al., J Am Chem Soc. 2012 Jun 13;134(23):9796-804.</p>

IV	<p data-bbox="355 271 767 300">NVP-HSP990 según la fórmula</p> <div data-bbox="424 421 963 797"><p>The chemical structure of NVP-HSP990 is a complex heterocyclic molecule. It features a central pyridine ring substituted with a methoxy group (-OCH<sub>3</sub>) at the 3-position and a 4-fluorophenyl group at the 2-position. This pyridine ring is linked via its 4-position to a 1,2,4-triazole ring. The triazole ring has a methyl group (-CH<sub>3</sub>) at the 5-position and an amino group (-NH<sub>2</sub>) at the 3-position. The 1-position of the triazole is connected to a piperazine ring. The piperazine ring has a carbonyl group (-C(=O)-NH-) at the 4-position and is further substituted with a 4-fluorophenyl group at the 2-position.</p></div> <p data-bbox="355 846 1410 929">tal y como se describe en Menezes DL et al., Mol Cancer Ther. 2012 Mar;11(3):730-9</p>
V	<p data-bbox="355 949 1078 978">IPI- 504, Retaspimycin hydrochloride, según la fórmula</p> <div data-bbox="360 994 903 1290"><p>The chemical structure of Retaspimycin hydrochloride is a complex polycyclic molecule. It consists of a central piperazine ring system. One nitrogen of the piperazine is substituted with a propylamine group (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>). The other nitrogen is substituted with a 4-hydroxyphenyl group (-NH-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-OH). The piperazine ring is further substituted with a methyl group (-CH<sub>3</sub>) and a hydroxyl group (-OH). The molecule also features a complex side chain containing a pyridine ring, a methyl group, and a primary amide group (-NH<sub>2</sub>).</p></div> <p data-bbox="355 1312 1334 1346">tal y como se describe en. Sequist Lecia V et al., JCO November 20, 2010</p>

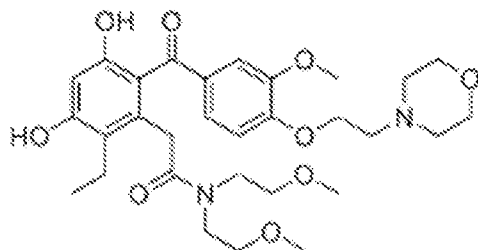
VI Moléculas que contienen resorcinol tales como

- NVP-AUY922 según la fórmula



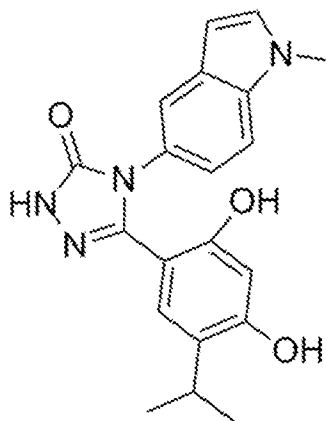
tal y como se describe en Eccles SA Cancer Res. 2008 Apr 15;68(8):2850-60

- KW-2478, según la fórmula



tal y como se describe en Nakashima T et al., Clin Cancer Res. 2010 May 15;16(10):2792-802

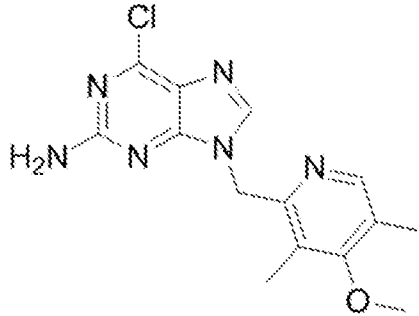
- STA-9090, HY-15205, ganetespib, según la fórmula



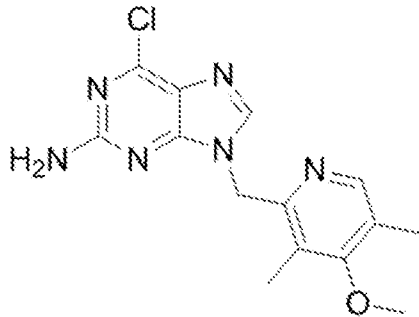
tal y como se describe en Wang Y. et al., Curr Opin Investig Drugs. 2010 Dec;11(12):1466-76.

VII Moléculas con esqueleto de purina tales como

- BIIB-021 Sinonimos CNF2024; BIIB-021; BIIB 021;CNF 2024;CNF-2024, según la fórmula

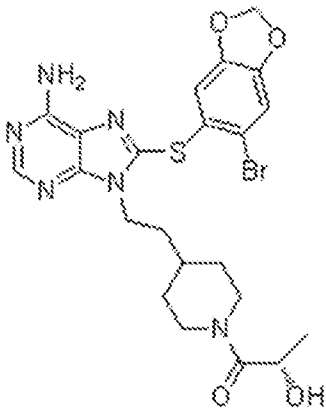


- PU-H71, según la fórmula

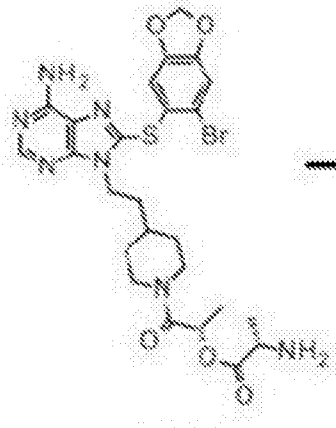


tal y como se describe en Gallerne C. et al., Biochim Biophys Acta. 2013 Jun;1833(6):

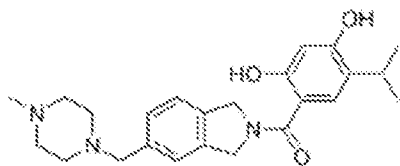
- MPC-3100, según la fórmula



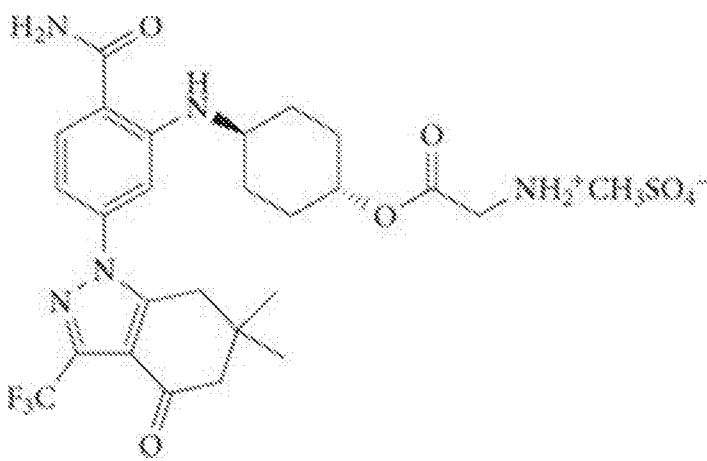
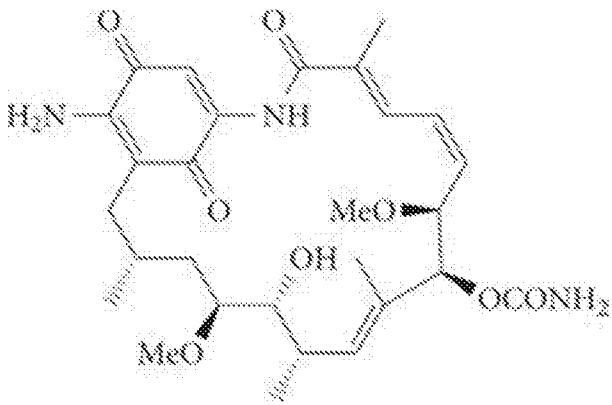
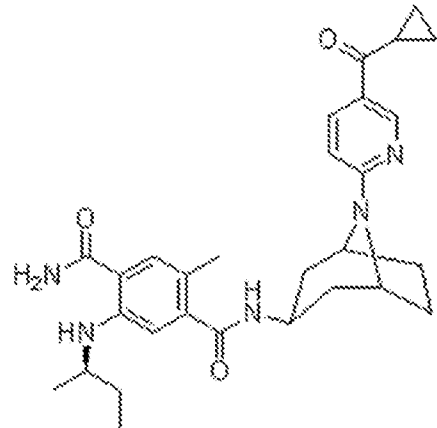
- MPC-0767, según la fórmula



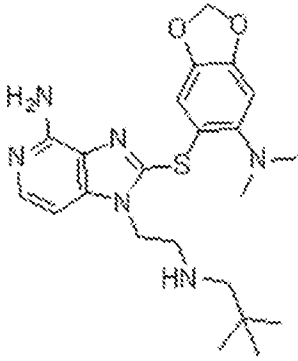
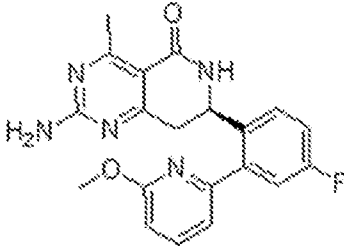
- AT13387 según la fórmula



VIII	4,5 diaril isoxazol
IX	BIIB-028

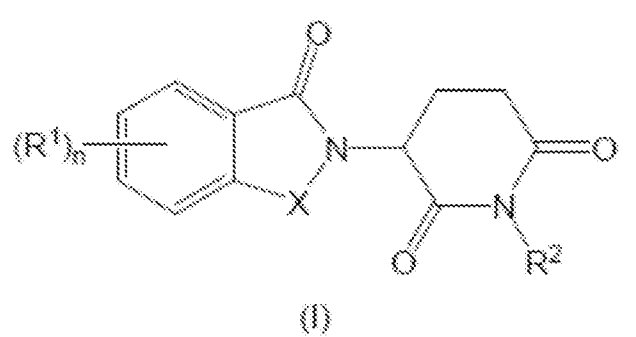
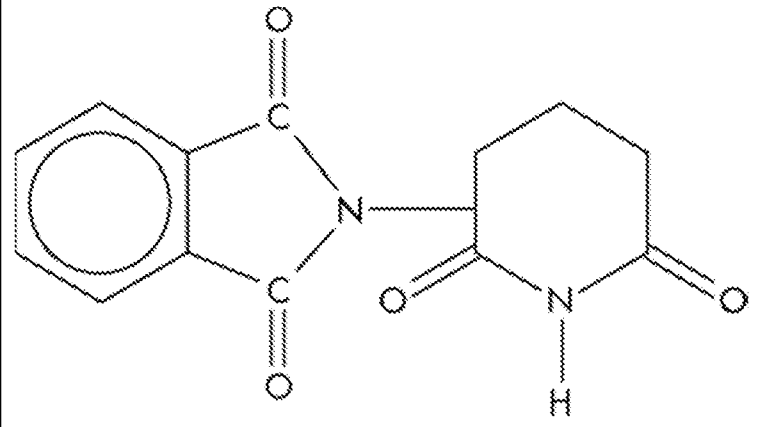
<p>X</p>	<p>SNX-5422, mesilato según la fórmula</p> 
<p>XI</p>	<p>IPI-493 según la fórmula</p> 
<p>XII</p>	<p>XL-888, según la fórmula</p> 

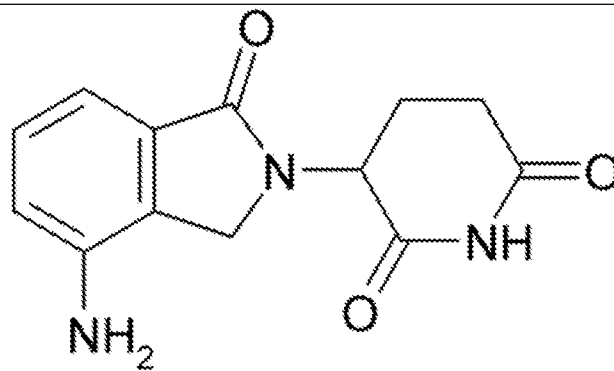


XIII	Debio 0932, según la fórmula <div style="text-align: center;">  </div>
XIV	NVP-HSP990, según la fórmula <div style="text-align: center;">  </div>
XV	Inhibidores genéricos de ATPasas como 5_ <i>N</i> -ethylcarboxamidoadenosine (NECA)
XVI	Anticuerpos inhibidores capaces de unirse específicamente a, e inhibir, la actividad de la GRP94
XVII	Un ARN de interferencia
XVIII	Una ribozima o enzima de ADN específica para la secuencia de la GRP94 tal y como la ribozima descrita en Little E. et al., J Biol Chem. 1995 Apr 21;270(16):9526-34
XIX	Un oligonucleótido antisentido específico para la secuencia de la GRP94
XX	Sobreexpresión de CYPE1 tal y como se describe en Dey A. et al., Arch Biochem Biophys. 2006 Mar 15;447(2):155-66.

En una realización particular el inhibidor de FN14 se seleccionada de la Tabla 2.

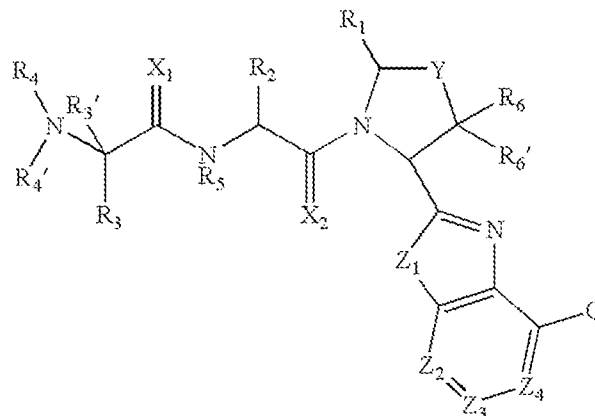
TABLA 2: INHIBIDORES DE FN14 ADECUADOS PARA SU USO EN LA PRESENTE INVENCION

I	<p>Derivados de talidomida tales como el compuesto de fórmula (I)</p>  <p>(I)</p> <p>en donde</p> <p>X se selecciona de <math>-\text{CH}_2-</math> y <math>-\text{C}(\text{O})</math>.;</p> <p><math>\text{R}^1</math> es independientemente seleccionado de halógeno, alquilo <math>\text{C}_1</math>-<math>\text{C}_6</math>, haloalquilo <math>\text{C}_1</math>-<math>\text{C}_6</math> y <math>\text{NR}'\text{R}''</math>, en donde <math>\text{R}'</math> y <math>\text{R}''</math> son independientemente seleccionados de H, y alquilo <math>\text{C}_1</math>-<math>\text{C}_6</math>;</p> <p><math>\text{R}^2</math> se selecciona de H y alquilo <math>\text{C}_1</math>-<math>\text{C}_6</math>; y</p> <p>N es un integrador seleccionado de 0,1,2,3 y 4;</p> <p>Por ejemplo, el compuesto con fórmula</p>  <p>Lenalidomida, según la fórmula</p>
---	--



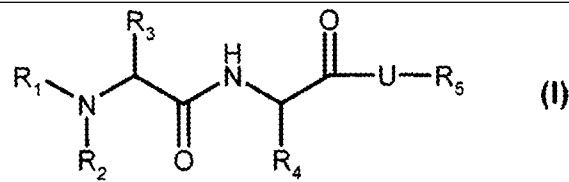
II Inhibidores de Inhibidores de apoptosis (IAPS), es decir compuestos que inhiben la actividad de una o más IAPs, tales como

- los compuestos descritos en WO 2012052758 A1
- antagonistas de IAP-BIR2, antagonistas de IAP-BIR3 o antagonistas IAP-BIR3/BIR2 tal y como se describen en Mannhold R. et al., Drug discovery today, Volume 15, Issues 5–6, March 2010, Pages 210–219
- Compuestos con fórmula general (I)



tal y como se describe en la patente US 8247557 B2

- Compuesto C y compuesto D tal y como se describen en WO 2005074989 A2
- Compuestos con la fórmula general



tal y como se describe en WO 2008067280 A2

III	Agentes que bloquean la interacción de Tweak y FN14, entre ellos anticuerpos Anti-Tweak tal y como se describe en Yumin Xia et al., Clinical Immunology Volume 145, Issue 2, November 2012, Pages 108–121
IV	Atorvastatina tal y como se describe en Muñoz-García B. et al, Stroke. 2006; 37: 2044-2053
V	Inhibidores de Geranylgeranyl transferasa, tales como GGTI descrito en Muñoz-García B. et al, Stroke. 2006; 37: 2044-2053
VI	Inhibidores de Rac y Rho tales como toxina B según se describe en Muñoz-García B. et al, Stroke. 2006; 37: 2044-2053
VII	Inhibidores de Rho, tales como C3 exoenzima tal y como se describe en Muñoz-García B. et al, Stroke. 2006; 37: 2044-2053
VIII	Inhibidores de Rho kinasa tales como Y-27632 descrito en Muñoz-García B. et al, Stroke. 2006; 37: 2044-2053
IX	Proteínas de unión a FN14 tales como las descritas en WO 2013026099 A1
X	Anticuerpos inhibidores capaces de unirse específicamente a, e inhibir, la actividad de la FN14
XI	Un ARN de interferencia
XII	Una ribozima o enzima de ADN específica para la secuencia de la FN14
XIII	Un oligonucleótido antisentido específico para la secuencia de FN14

Por "anticuerpo inhibidor" se entiende, en el contexto de la presente invención, todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse a la proteína grp94 o a fn14 de manera específica e inhibir una o más de las funciones de dichas proteínas. Los anticuerpos pueden ser preparados usando cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la materia. Así, los anticuerpos policlonales se pueden preparar mediante inmunización de un animal con la proteína que se desea inhibir. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el método descrito por Kohler, Milstein y col. (Nature, 1975, 256: 495). Anticuerpos adecuados en el contexto de la presente invención incluyen anticuerpos intactos que comprende una región variable de unión a antígeno y una región constante, fragmentos "Fab", "F(ab')<sub>2</sub>" y "Fab", Fv, scFv, diabodies y anticuerpos biespecíficos. Una vez identificados anticuerpos con capacidad de unión a la proteína grp94, se seleccionarán aquellos capaces de inhibir la actividad de esta proteína usando un ensayo de identificación de agentes inhibidores.

Anticuerpos de grp94 que pueden emplearse en la presente invención son por ejemplos los descritos en la Tabla de la solicitud US2012148598. Anticuerpos de fn14 que pueden emplearse en la presente invención son por ejemplo PDL192 y P4A8 o los descritos en EP 2294089 A2.

Los ARN de interferencia pequeños o ARNip (ARNip en su denominación en inglés) son agentes que son capaces de inhibir la expresión de un gen diana mediante interferencia de ARN. Un ARNip se puede sintetizar químicamente, se puede obtener mediante transcripción *in vitro* o se puede sintetizar *in vivo* en la célula diana.

Típicamente, los ARNip consisten en una cadena doble de ARN de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud y que puede contener una región protuberante 3' y/o 5' de 1 a 6 nucleótidos. La longitud de la región protuberante es independiente de la longitud total de la molécula de ARNip. Los ARNip actúan mediante la degradación o el silenciamiento post-transcripcional del mensajero diana.

Los ARNip de la invención son sustancialmente homólogos al ARNm del gen que codifica GRP94 o a la secuencia genómica que codifica dicha proteína. Por "sustancialmente homólogos" se entiende que tienen una secuencia que es

suficientemente complementaria o similar al ARNm diana, de forma que el ARNip sea capaz de provocar la degradación de éste por interferencia de ARN. Los ARNip adecuados para provocar dicha interferencia incluyen ARNip formados por ARN, así como ARNip que contienen distintas modificaciones químicas tales como:

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

ARNip específicos para GRP94 incluyen los ARNip descritos en US20090186039 tales como 5'-UGA UGU GGA UGG UACAGU A-3' (SEQ ID NO: 1), 5'-UAC UGU ACC AUC

20 CAC AUC A-3' (SEQ ID NO: 2), 5'-GAA GAA GCA UCU GAU UAC C-3' (SEQ ID NO: 3), 5'-GCC UUC CAA GCC GAA GUU A-3' (SEQ ID NO: 4), 5'-CCU UCC AAG CCG AAG UUA A-3' (SEQ ID NO: 5), 5'-UCU GGA AAU GAG GAA CUA A-3' (SEQ ID NO: 6), 5'-CCU UGG UAC CAU AGC CAA A-3' (SEQ ID NO: 7), 5'-GCA UCU GAU UAC CUV GAA U-3' (SEQ ID NO: 8), 5'-GGA GUC UGA CUC CAA UGA A-3' (SEQ ID NO:

25 9.

ARNip específicos de FN14 incluyen los ARNip 5'-GGAUUCGGC UUG GUG UUG AUU3' (SEQ ID NO: 10); 5'-CGU CGUCCAUUCUUAUUUU-3' (SEQ ID NO: 11); 5'-GGACUGGGCUUAGAGUUCAUU-3' (SEQ ID NO: 12); and 5'-

30 CUAAGGAACUGCAGCAUUUUU-3' (SEQ ID NO: 13).

Por otro lado, la invención también contempla el uso de enzimas de ADN para inhibir la expresión del gen GRP94 o del gen FN14. Las enzimas de ADN incorporan algunas de las características mecánicas tanto de las tecnologías de antisentido como de las

35 de ribozimas. Las enzimas de ADN se diseñan de modo que reconozcan una

secuencia diana de ácido nucleico particular, parecido al oligonucleótido antisentido, sin embargo parecido a la ribozima son catalíticas y cortan específicamente el ácido nucleico diana.

5 También se pueden usar moléculas de ribozimas diseñadas para cortar de forma catalítica transcritos de un ARNm diana para prevenir la traducción de los ARNms que codifican GRP94 o FN14 y cuya actividad se desea inhibir. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar el corte específico de ARN (Para una revisión, ver, Rossi, Current Biology 4: 469-471, 1994). El mecanismo de acción  
10 de la ribozima implica hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima a un ARN diana complementario, seguido por un suceso de corte endonucleolítico. La composición de las moléculas de ribozima preferiblemente incluye una o más secuencias complementarias al ARNm diana, y la bien conocida secuencia responsable del corte del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente (ver, por  
15 ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5093246).

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

20

El término “oligonucleótido antisentido”, según se usa en la presente invención, se refiere a un polinucleótido que es capaz de hibridar de forma específica con un ADN o ARN determinado e incluye tanto oligonucleótidos de ADN, de ARN o de mezclas quiméricas, así como oligonucleótidos de cadena sencilla o de cadena doble.

25

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de ácidos nucleicos “antisentido” aislados para inhibir la expresión, por ejemplo inhibiendo la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico que codifica GRP94 o FN14 cuya actividad se desea inhibir. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden unir a la diana potencial mediante  
30 complementariedad de bases convencional o, por ejemplo, en el caso de unirse a ADN bicatenario, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. En general, estos métodos se refieren al rango de técnicas generalmente empleadas en la técnica e incluyen cualquier método que se basa en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

35

Una construcción antisentido de la presente invención se puede distribuir, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que es complementario a al menos una parte única del ARNm celular que codifica GRP94 o FN14. De forma alternativa, la construcción antisentido es una sonda de oligonucleótidos que se genera *ex vivo* y que, cuando se introduce en la célula, produce inhibición de la expresión génica hibridando con el ARNm y/o secuencias genómicas de un ácido nucleico diana. Tales sondas de oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados, que son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y que son por lo tanto estables *in vivo*. Moléculas de ácidos nucleicos ejemplares para su uso como oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN de fosforamidoato, fosfotionato y metilfosfonato (ver también las patentes de EE.UU. Nos. 5176996; 5264564; y 5256775). Adicionalmente, se han revisado las aproximaciones generales para construir oligómeros útiles en la terapia antisentido, por ejemplo, en Van der Krol et al., *BioTechniques* 6: 958-976, 1988; y Stein et al., *Cancer Res* 48: 2659-2668, 1988

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

Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del ARNm, por ejemplo la secuencia 5' no traducida hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, deberían funcionar de la forma más eficaz para inhibir la traducción. Sin embargo, se ha mostrado recientemente que las secuencias complementarias a las secuencias 3' no traducidas de los ARNm también son eficaces para inhibir la traducción de los ARNMs (Wagner, *Nature* 372: 333, 1994). Por lo tanto, se podrían usar oligonucleótidos complementarios bien a las regiones 5' ó 3' no traducidas, no codificantes de un gen en una aproximación antisentido para inhibir la traducción de ese ARNm. Los oligonucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm deberían incluir el complemento del codón de iniciación AUG. Los oligonucleótidos complementarios a las regiones codificantes del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficaces pero también se podrían usar según la invención. Si están



diseñados para hibridar con la región 5', 3' o codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deberían tener al menos seis nucleótidos de longitud y tener preferiblemente menos de alrededor de 100 y más preferiblemente menos de alrededor de 50, 25, 17 ó 10 nucleótidos de longitud.

5

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

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

30

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

35

denominan oligómeros ácido nucleico peptídico (ANP) y se describen, por ejemplo, en Perry-O'Keefe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 14670, 1996, y en Eglom et al., Nature 365: 566, 1993.

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

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

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

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

25 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la metástasis cerebral.

Las composiciones de la invención para la fabricación de un medicamento para su uso  
30 de acuerdo a la presente invención se pueden administrar por cualquier vía adecuada de administración, por ejemplo una vía oral, sublingual, tópica, rectal o parenteral incluyendo vía subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intravascular, intratumoral, intracraneal, intratecal, intraesplénica, intramuscular, subretinal, y mucosa.

35

En una realización particular de la invención, el medicamento es administrado de manera intratecal y/o intratumoral.

5 Como entiende el experto en la materia, en ocasiones la administración directa de la composición de la invención al sitio que se pretende beneficiar puede ser ventajosa. De este modo, la administración directa de la composición de la invención al órgano o tejido deseado se puede lograr por administración directa (e.g., por inyección, etc.) en la superficie externa del órgano o tejido afectado por medio de inserción de un dispositivo adecuado, e.g., una cánula o bomba de administración apropiada, por  
10 perfusión arterial o venosa (incluyendo mecanismos de flujo retrógrado) o por otros medios mencionados en esta descripción o conocidos en la técnica. En el caso de la administración directa en el cerebro, es común el uso de un catéter en el sistema ventricular a través de punción intratecal o bomba de administración para evitar la barrera hematoencefálica.

15

En cualquier caso, es preferible que si la composición de la invención se va a administrar por un medio distinto al intracraneal, la formulación de dicho compuesto debe permitir que atraviese la barrera hematoencefálica.

20 La entrada de moléculas al cerebro está controlada eficientemente por la barrera hematoencefálica, de manera que solamente las moléculas pequeñas lipofílicas son capaces de atravesarla por difusión pasiva. Por tanto, es conveniente que para su uso según la invención, la composición de la invención sea capaz de atravesar la barrera hamatoencefálica en cantidades suficientes como para tener un efecto farmacológico  
25 deseado.

Los criterios que debe cumplir un compuesto para atravesar de manera pasiva la barrera hematoencefálica se divulgan por ejemplo en la Tabla 2.1 del documento de Gynther M. Publicatins of the University of Eastern Finland, Dissertations in Health  
30 Sciences, 2010.

Existen diversos métodos conocidos en el estado de la técnica que permiten determinar y estimar la permeabilización del cerebro a las distintas drogas. Destacan entre ellos los modelos *in vitro* tales como en capilares aislados de cerebro, cultivos de  
35 células endoteliales capilares cerebrales y membranas artificiales inmortalizadas, tal y

como se describe en Lundquist and Renftel *Vascul Pharmacol* 38: 355-364, 2002. También es posible emplear astrocitos como modelo, tal y como se describe en Li et al., 2010 o un modelo de cartucho de fibra hueca tal y como se describe en Neuhaus et al., 2006. Otros modelos son el modelo de reperusión en cerebro de rata tal y como se describe en (Takasato et al., *Am J Physiol* 247: H484-493, 1984) o microdiálisis de cerebro (de Lange et al., *Adv Drug Deliv Rev* 36: 211-227, 1999).

Con el fin de que puedan atravesar la barrera hematoencefálica, los oligonucleótidos antisentido pueden incluir otros grupos unidos, tales como los agentes descritos en WO89/10134.

Alternativamente es preferido que el compuesto sea liposoluble o modificarlo para que sea liposoluble, por ejemplo bloqueando los grupos hidroxilo, carboxilo y las aminas primarias. Alternativamente es posible administrar de manera intra arterial una solución hipertónica de manera que transitoriamente abran la barrera hematoencefálica y permitan el paso de drogas hidrofílicas. Alternativamente es posible emplear algunos transportadores presentes en el endotelio de los capilares cerebrales tales como LAT y Glut1, modificando las drogas de manera que sean reconocidas por dichos transportadores tal y como se describe en Rautio et al., *Aaps J* 10: 92-102 2008 y en Gynther M. *Publicatins of the University of Eastern Finland, Dissertations in Health Sciences*, 2010.

En una realización particular, las composiciones de la invención se encuentran en sistemas de encapsulación. Se conoce en la técnica una variedad de sistemas de encapsulación adecuados ("Microcapsules and nanoparticles in Medicine and Pharmacy", editado por Doubrow, M., CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz y Langer *J. Control. Release* 5:13, 1987; Mathiowitz et al. *Reactive Polimers* 6:275, 1987; Mathiowitz et al. *J. Appl. Polimer Sci.* 35:755, 1988; Langer *Ace. Chem. Res.* 33:94,2000; Langer *J. Control. Release* 62:7,1999; Uhrich et al. *Chem. Rev.* 99:3181,1999; Zhou et al. *J. Control. Release* 75:27, 2001; y Hanes et al. *Pharm. Biotechnol.* 6:389,1995. De entre estos sistemas destaca fundamentalmente la elaboración de suspensiones coloidales, tales como liposomas, microemulsiones, nanoesferas y nanopartículas, basadas en la formación de una fase oleosa en la cual se incorpora el ingrediente activo, dispersa en una fase acuosa, gracias a la utilización de uno o varios agentes tensoactivos. Los liposomas se pueden preparar utilizando

técnicas convencionales incluyendo sonicación, diálisis con quelatos, homogenización, infusión de disolvente acoplada con extrusión, extrusión por congelación-descongelación, microemulsificación, así como otras. Los reactivos utilizados para reticular un liposoma u otro agente que contiene lípido comprenden un derivado de fosfolípido para anclarse a un extremo de la reticulación en la capa lipídica y un grupo reactivo en el otro extremo para proporcionar un punto de unión a la biomolécula diana.

Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan de forma selectiva a células u órganos específicos, potenciando así la administración de fármacos dirigida (véase, p. ej., V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Los ejemplos de restos que se dirigen a objetivos incluyen folato o biotina (véase, p. ej., la patente de EE. UU. 5.416.016 de Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); el receptor de proteína A tensioactiva (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); pág. 120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véanse también K. Keinanen; MX. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Para su aplicación en terapia, las composiciones de la invención se encontrarán preferiblemente en forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, las composiciones de la invención tienen un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los excipientes farmacéuticamente aceptables y sin incluir material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para compuestos preferiblemente superan el 50%, más preferiblemente superan el 70%, más preferiblemente superan el 90%. En una forma de realización preferida, superan el 95%.

Los composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administrados en dosis de menos de 10 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente menos de 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005 ó 0.00001 mg por cada kg de peso corporal. La dosis unitaria se puede administrar por inyección, por inhalación o por administración tópica.

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

20

La invención se describe ahora en detalle por medio de los siguientes ejemplos que se deben considerar como meramente ilustrativos y no limitantes del ámbito de la invención.

## 25 EJEMPLOS

*Ejemplo 1- Efecto de la inhibición de la expresión de GRP94*

Las células 435BR que metastatizan en cerebro, derivadas de las células de cáncer de  
30 mama MDA-MB 435, se utilizaron para seleccionar un fenotipo altamente metastático en cerebro cuando se inyectan en ventrículo izquierdo (v.i.) y/o en la carótida interna (c.i.). Tras infectarlas con un retrovirus que contiene el gen de la luciferasa y la proteína verde (eGFP-CMV/Luc), se hicieron 5 pases sucesivos *in vivo/in vitro* en el que las células se inyectaban en v.i. de ratones inmunodeprimidos y cuando  
35 desarrollaban metástasis se hacían cultivo primarios para volver a inyectar en el

animal de experimentación (Figura 1). Las células del quinto pase, BRV5, se inyectaron en la carótida interna y se obtuvo una nueva variante BRV5CA1 que producía la muerte por metástasis cerebral de todos los ratones (Martínez-Aranda A., *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14(4), 8306-8327).

5

Las células que metastatizan en cerebro se caracterizan por su alto nivel de expresión de GRP94, por lo que para estudiar la causa-efecto de esta proteína sobre el proceso de metástasis cerebral se procedió a su silenciamiento.

10 La variante metastática a cerebro BRV5CA1 se transformó con los 5 ARNhp para GRP94 comerciales de Sigma-Aldrich (MISSION® ARNhp Bacterial Glycerol Stock, Sigma-Aldrich). De las 5 líneas generadas se obtuvieron clones por dilución límite. Se seleccionaron aquellos clones que tenían la GRP94 silenciada, mediante western blot, PCR e inmunofluorescencia.

15

Para estudiar la relación entre el nivel de expresión de la GRP94 y la respuesta al taxol de las células de cáncer de mama que metastatizan a cerebro, se utilizaron tres sublíneas: Clones: 424-2 y 424-8 (tienen silenciada GRP94 [shGRP94]) y un Pool (GRP94 no silenciada), procedentes de la variante metastática BRV5Ca1.

20

Para el ensayo de citotoxicidad se sembró cada tipo celular por triplicado en una placa de 96 pocillos (*costar® 3596; Corning Incorporated*), a una densidad de 6000 cel/pocillo en 50 µL de medio completo (*DMEM/F12 GIBCO® con suero*). Transcurridas 24 h desde la siembra de las células, éstas se trataron con Taxotere (Docetaxel >99%;

25 LC Laboratories ([www.LCLabs.com](http://www.LCLabs.com)); Stock 200mg/ml), a diferentes concentraciones por triplicado: 10 - 5 - 2,5 - 1 y 0 ng/ml, en un volumen de 50 µL/pocillo. A las 72 horas del inicio del tratamiento se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular MTT, en el que se analizó la supervivencia expresada en porcentaje (%) (Figura 2). Previamente al ensayo (10 minutos antes), se incluyó un control negativo tratando las células con  
30 Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, *CAS Number: 9002-93-1*), en un volumen de 30µL/pocillo, para obtener el valor de máxima mortalidad.

Transcurrido este tiempo, se aspiró el medio de los pocillos y se añadió 50µL/pocillo de MTT [*3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol*; Sigma-Aldrich], a una  
35 concentración de 5mg MTT/ml medio sin suero. Se incubaron las células a 37°C

durante 2-4 horas aprox. a oscuras. Después, se aspiró el MTT y se añadió 100 µL/pocillo de DMSO 100% (*Sigma Aldrich*). Se dejó en agitación durante 10-15 minutos (a oscuras) y posteriormente se analizó en el espectrofotómetro de microplacas (*PowerWave™ XS; BioTek*), a una longitud de onda de 540 nm.

5

Para cada una de las concentraciones de tratamiento establecidas, se obtuvieron valores de absorbancia (DO) por triplicado. La media calculada se expresó en referencia a su control (0 ng/ml), considerado como el valor de supervivencia máximo (100%).

10

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{Absorbancia tratamiento}}{\text{Absorbancia Control}} * 100$$

Como se observa en la figura 2, las células 424-2 y 424-8 presentan una menor supervivencia tras el tratamiento con taxol.

15

#### *Ejemplo 2- Efecto del taxotere en el crecimiento de tumores*

Se utilizó un xenotransplante de cáncer de mama que metastatizaba en cerebro, cedidos por la Dra Eva Gonzalez, para inducir tumores de mama en ratones inmunodeprimidos Athymic Nude-Foxn1nu de 22-28 gr de peso adquiridos a Charles-River Laboratories (Wilmington, MA) y establecer grupos de tratamiento o no con taxotere siguiendo un protocolo estándar de 15 mg/Kg/día cada 4 días durante dos semanas, previamente establecido (Bin Gu et al., *Carcinogenesis*, 2004). La pieza de tumor de 2 mm<sup>3</sup> aproximadamente se implantó en la mama inguinal de los ratones hembra y se esperó 10 días para que el injerto progresara. Tras evaluar el volumen del tumor se inició el tratamiento con taxotere, considerando en cada caso un grupo control que era tratado con el vehículo de la droga.

Se examinó la expresión de la proteína grp94 en los tumores control y en los tratados para estudiar posibles modificaciones de expresión secundarios al tratamiento.

En la Figura 3 se muestra la evolución de las medias de la variable respuesta (volumen normalizado, dividido por el volumen inicial al inicio de tratamiento) desde el día de inicio para cada uno de los grupos. En esta gráfica se ve como la variable



tiempo tiene un efecto muy positivo y significativo en el crecimiento del tumor de los ratones tratados con el vehículo (control). A pesar de que los tumores tratados con taxotere muestran una tendencia a crecer inferior a la de los controles ( $p=0.003$ ), progresan en el tiempo. La interacción entre el tiempo y el tratamiento con taxotere es negativa y significativa ( $p=0.003$ ), indicando que los tumores tratados con taxotere tienen una tendencia a crecer inferior a la del control.

*Ejemplo 3- Relación de la expresión de GRP94 y/o FN14 con el riesgo de padecer metástasis cerebral.*

10

Se ha realizado un estudio multicéntrico que incluye 318 muestras de tumor de pacientes con cáncer de mama y se ha analizado la expresión de GRP94 y FN14 en tejido parafinado proveniente del archivo de Anatomía Patológica de tres hospitales. Además de estos marcadores binarios se ha tenido en cuenta las siguientes covariables: Tamaño del tumor, inferior o superior a 20 mm; grado histológico, 1,2 y 3; presencia de ganglios afectados: 0 ganglios +, 1-3 ganglios +, 4 o más ganglios +; receptores de estrógeno (ER) y de progesterona (EP): negativo o positivo; HER2: negativo/ténue o positivo; quimioterapia adyuvante: Taxanos o no-taxanos y hormonoterapia adyuvante inicial: si o no.

20

Para comprobar si los marcadores mantienen su significación en presencia de estas covariables (todas ellas binarias o con 3 categorías, cogiéndose como referencia la primera categoría), se han realizado modelos multivariados de cada marcador incluyendo el efecto de las covariables (Figura 4). Los datos de sensibilidad y especificidad se muestran en la Tabla 3.

MARCADOR	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
HER2	24.68%	89.55%
GRP94	65.06%	57.83%
FN14	38.27%,	89.43%
GRP94 + FN14	74.07%,	51.98%
GRP94 + FN14 + HER2	72.37%	53.49%

TABLA 3. Valores de sensibilidad y especificidad obtenidos de cada marcador.

El análisis multivariado indica que la detección de la expresión de GRP94 (AUC =0.61) aisladamente y FN14 (AUC=0.64) aisladamente es mejor para predecir el riesgo de metástasis cerebral comparado con HER2 (AUC =0.57). La combinación de GRP94 y  
5 FN14 es aún mejor (AUC =0.69) (Figura 4 D).

Las curvas de supervivencia a la metástasis cerebral se han calculado considerando si un paciente ha sufrido metástasis cerebral, como un suceso en el momento en que se ha registrado esta metástasis. Si un paciente no la ha sufrido, se considera censurado  
10 al final del período de seguimiento (Modelo de Cox). En la Figura 5 se muestran las curvas de supervivencia atendiendo a que el paciente tenga un tumor que sobreexpresase o no FN14. Se representa el tiempo libre de metástasis cerebral de las pacientes que han seguido pautas terapéuticas con taxanos u otras (que no incluía el taxano). La expresión de FN14 se asocia de forma significativa a la supervivencia libre  
15 de enfermedad según las pacientes hayan seguido terapias con Taxanos o no-Taxanos (n = 37; p = 0.0475).

#### *Ejemplo 4- Lenalidomida inhibe la expresión de FN14*

20 Tumores experimentales inducidos en la mama de los ratones inmunodeprimidos al implantarles pequeñas piezas (2x2 mm) de biopsia de pacientes con carcinomas de mama triple negativos. Se muestra un ejemplo de uno de estos injertos tratado con Lenalidomida (LND) respecto al mismo injerto tratado con el vehículo (Control).

25 Para los estudios de expresión se utilizó la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos anti-FN14 (sc-27143, C-13, Santa Cruz Biotechnology) a concentración 1/3000. Como tejidos control se utilizó riñón y corazón para visualizar la expresión en la membrana de las células. Los antígenos se desenmascararon calentando las preparaciones en una olla a presión durante 7 minutos en el tampón  
30 citrato apropiado (Sanz et al., Am J Pathol, 179(2):564-579, 2011).

El anticuerpo primario se diluyó en el tampón diluyente Dako (Dako, Glostrup, Dinamarca; Carpintería, CA): Tris tampón, pH 7,2, 15 mmoles / L de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. El sistema de peroxidasa LSAB (Dako), incluyendo el anticuerpo secundario biotinilado, seguido  
35 de la estreptavidina conjugada se utilizó junto con el kit de detección ultraView

(Ventana Benchmark XT, Roche, Tucson, AZ). Los tumores se clasificaron en tres categorías atendiendo a la intensidad de la tinción: negativo, positivo débil y fuertemente positivo. Solo aquellos fuertemente positivos en más de un 30% de las células tumorales se consideraron con la proteína sobreexpresada.

5

La figura 6 muestra la inhibición de la expresión de FN14 tras el tratamiento con lenalidomida.

*Ejemplo 5- Efecto terapéutico de un inhibidor de FN14.*

10

El efecto terapéutico de Lenalidomida se analizó tratando las metástasis cerebrales de cáncer de mama inducidas inyectando las células BRV5CA1 marcadas con el gen de la luciferasa en ratones hembras AthymicNude-Foxn1nu (Martínez-Aranda A., *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14(4), 8306-8327). Se establecieron los grupos de tratamiento N= 8 (Lenalidomida 50 mg/Kg/d en días consecutivos) y el grupo control que se inyectaba con el vehículo. El inicio del tratamiento se establecía a día 14 después del injerto y se mantenía 15 días hasta el final de experimento. El tratamiento se iniciaba a día 13 después de la inducción y se seguía la evolución del crecimiento de la metástasis *in vivo* cuantificando la emisión de luciferasa (fotones por segundo) (Figura 7). A la semana de tratamiento la diferencia en el crecimiento de la metástasis entre el control y los tratados era significativa.

15  
20

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para predecir metástasis en un sujeto diagnosticado con cáncer de mama y tratado con un taxano que comprende
  - 5 i) determinar el nivel de expresión del gen GRP94 y/o el nivel de expresión del gen FN14 en una muestra dicho sujeto y
  - ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de referencia para cada genen donde un nivel de expresión de GRP94 y/o un nivel de FN14 incrementado con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de alto riesgo de desarrollar metástasis o en donde un nivel de expresión de GRP94 y/o un nivel de FN14 disminuido con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de bajo riesgo de desarrollar metástasis.  
10
  
- 15 2. Método *in vitro* para la selección de pacientes de cáncer de mama que presentan riesgo de desarrollar metástasis tras el tratamiento con taxano que comprende
  - i) determinar el nivel de expresión del gen GRP94 y/o el nivel de expresión del gen FN14 en una muestra dicho sujeto y
  - ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de referencia para cada genen donde un el nivel de expresión de GRP94 y/o un nivel de FN14 disminuido con respecto a dicho valor de referencia es indicativo de que dicho paciente tiene bajo riesgo de desarrollar metástasis tras el tratamiento con taxano.  
20
  
- 25 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en donde la metástasis es metástasis cerebral.
  
4. Método *in vitro* para el diseño de una terapia personalizada de un sujeto que sufre de cáncer de mama y que está siendo tratado con taxano que comprende
  - 30 i) determinar el nivel de expresión del gen GRP94 y/o el nivel de expresión del gen FN14 en una muestra dicho sujeto y
  - ii) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa i) con un valor de referencia para cada genen donde si el nivel de expresión de GRP94 y/o el nivel de FN14 está disminuido con respecto a dicho valor de referencia entonces dicho sujeto no es susceptible  
35

- de ser tratado con un agente adecuado para el tratamiento de la metástasis cerebral o en donde si el nivel de expresión de GRP94 y/o el nivel de FN14 está incrementado con respecto a dicho valor de referencia entonces dicho sujeto es susceptible de recibir un tratamiento con un agente adecuado para el tratamiento de la metástasis cerebral.
- 5
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la cuantificación del nivel de expresión del gen GRP94 y/o del gen FN14 comprende la cuantificación de los niveles de proteína codificada por dicho gen o de una variante de la misma.
- 10
6. Método según la reivindicación 5 en donde los niveles de proteína se cuantifican por medio de inmunohistoquímica, Western blot, ELISA o un array de proteínas.
- 15
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la cuantificación del nivel de expresión del gen GRP94 y/o del gen FN14 comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dicho gen, o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario (ADNc) de dicho gen, o un fragmento de dicho ADNc.
- 20
8. Método según la reivindicación 7 en donde el nivel de expresión se cuantifica por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o por medio de una matriz de ADN o de ARN o mediante técnicas de hibridación de nucleótidos.
- 25
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde la muestra es una muestra de tejido tumoral.
- 30
10. Uso de un agente adecuado para el tratamiento de la metástasis cerebral para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de metástasis cerebral en un sujeto que presenta unos niveles de GRP94 incrementados respecto a un valor de referencia y que ha sido tratado con taxano.
- 35
11. Uso de un taxano para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la metástasis cerebral en un sujeto que presenta unos niveles de GRP94

disminuidos respecto a un valor de referencia.

- 5 12. Composición que comprende un taxano y un inhibidor de GRP94 y/o un inhibidor de FN14, en donde si el taxano es docetaxel entonces el inhibidor de FN14 no es el compuesto de fórmula (I) de la Tabla 2.
13. Composición según la reivindicación 12 en donde el inhibidor de GRP94 se selecciona de un compuesto de la Tabla 1.
- 10 14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13 en donde el inhibidor de FN14 se selecciona de un compuesto de la Tabla 2.
- 15 15. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de metástasis cerebral.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o usos según las reivindicaciones 10, 11 y 15 o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 en donde el taxano se selecciona del grupo formado por docetaxel y paclitaxel.
- 20 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 y 16, o uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 15 en donde el agente adecuado para el tratamiento o prevención de la metástasis cerebral se selecciona del grupo formado por agente antiangiogénico, inhibidor de hsp90, inhibidor del factor de crecimiento epidérmico, inhibidor de HDAC, inhibidor de PARP, inhibidor de BRAF e inhibidor de tirosina quinasa.
- 25 18. Método o uso según la reivindicación 17 en donde el agente antiangiogénico se selecciona del grupo formado por Bevacizumab, Sunitinib, endostatina, Sorafenib y Cilengitide.
- 30 19. Método o uso según la reivindicación 17, composición según la reivindicación 10 o uso según la reivindicación 12 en donde el inhibidor de HSP90 es 17-(Dimethylaminoethylamino)-17-Demethoxygeldanamycin.
- 35 20. Método o uso según la reivindicación 17 en donde el inhibidor del factor de crecimiento epidérmico se selecciona del grupo formado por trastuzumab,

erlotinib, lapatinib, HKI-272, afatinib, gefitinib e Icotinib.

21. Método o uso según la reivindicación 17 en donde el inhibidor de HDAC se selecciona del grupo formado por vorinostat y panobinostat.

5

22. Método o uso según la reivindicación 17 en donde el inhibidor de PARP se selecciona del grupo formado por Iniparib, olaparib y veliparib.

10

23. Método o uso según la reivindicación 17 en donde el inhibidor de BRAF es Vemurafenib.

24. Método o uso según la reivindicación 17 en donde el inhibidor de tirosina quinasa se selecciona del grupo formado por sunitinib, sorafenib y pazopanib.

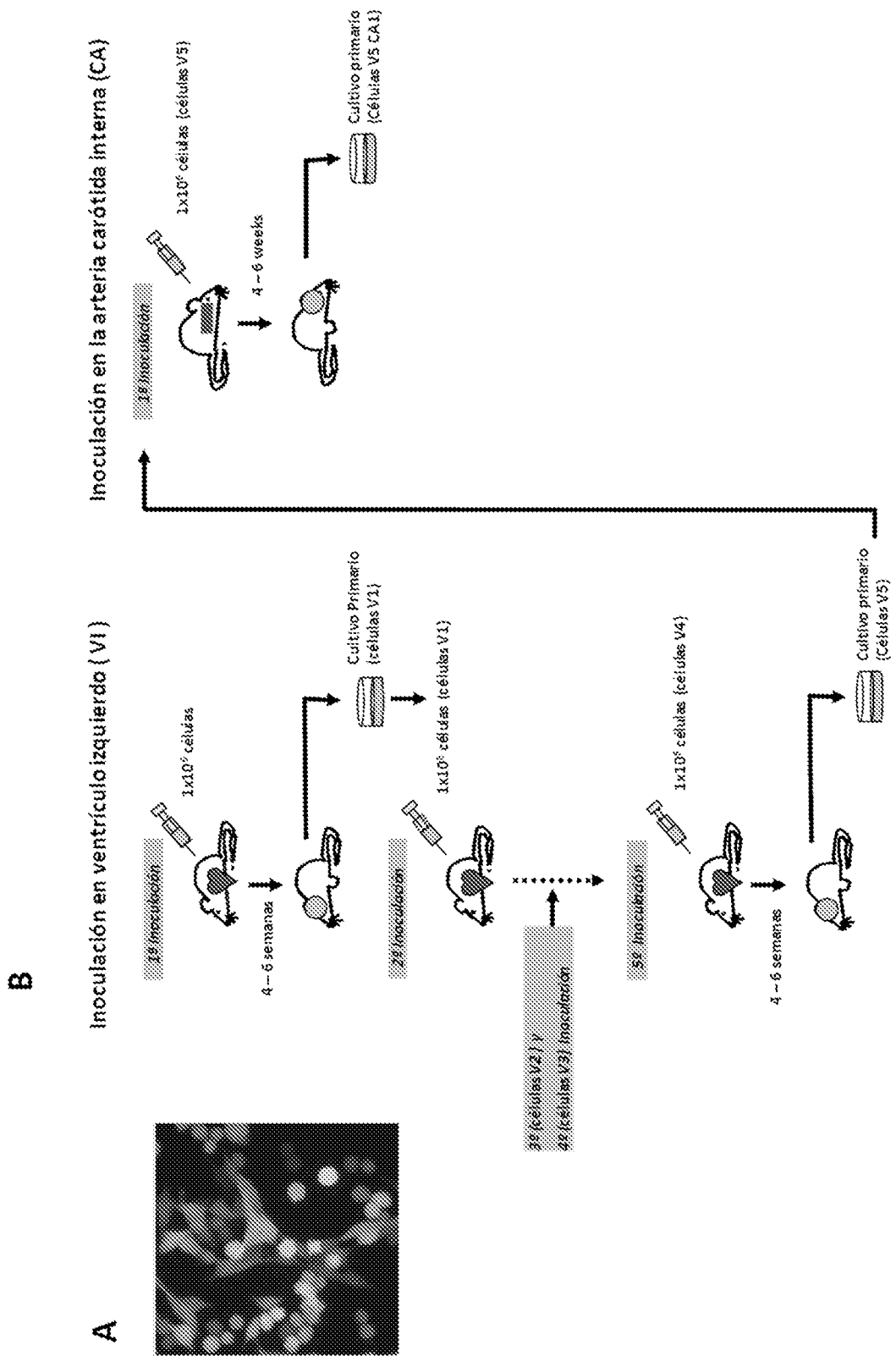
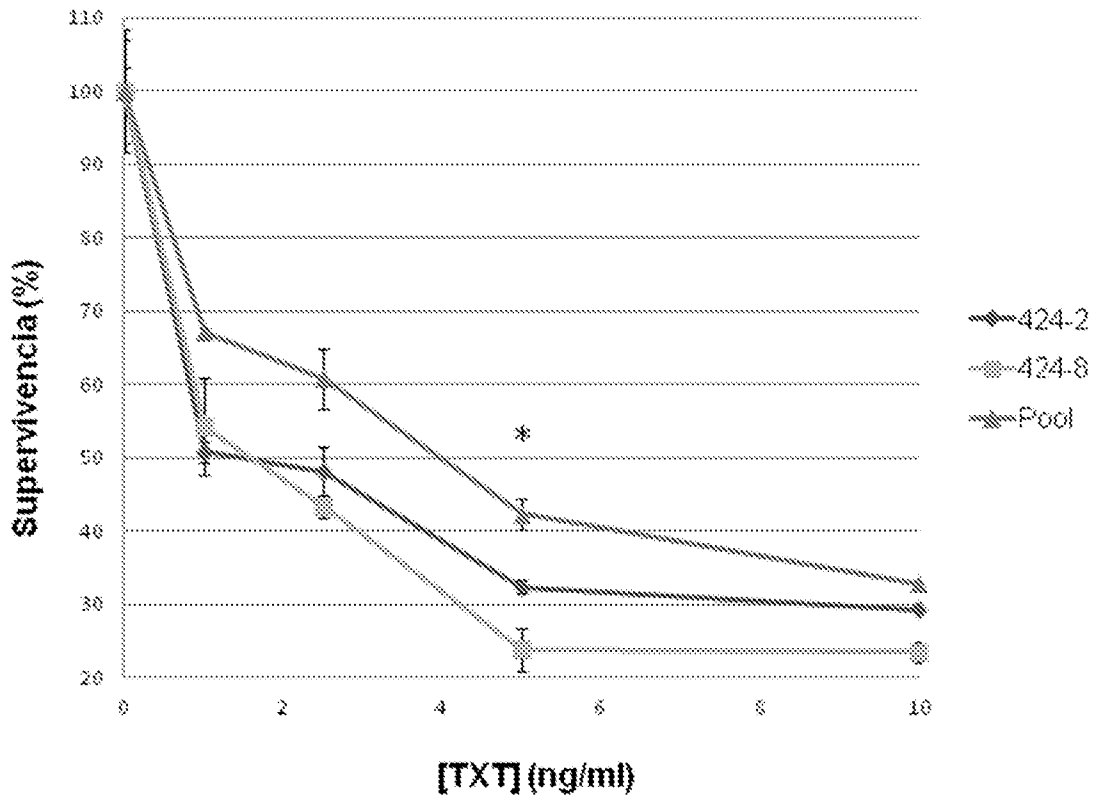


FIGURA 1



**Células siGRP94 424-2 y 424-8**



\* p= 0,03 & p= 0,01

IC50: 424-2 1,5 ng/ml; 424-8 1,59 ng/ml; Pool 3,95 ng/ml

FIGURA 2

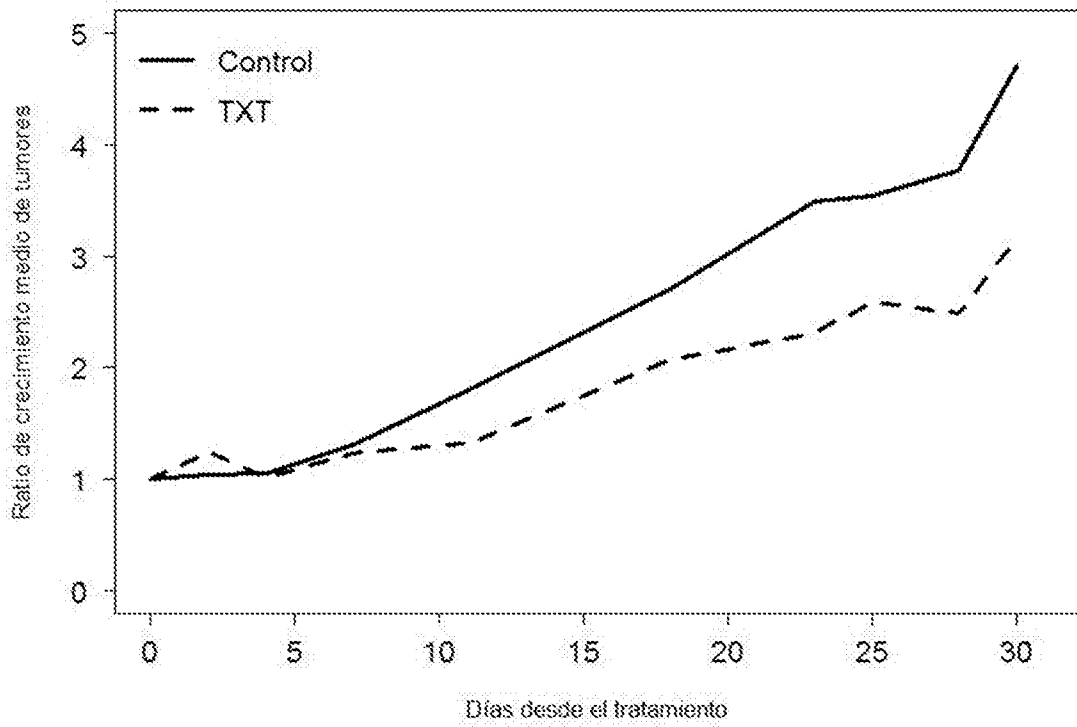


FIGURA 3

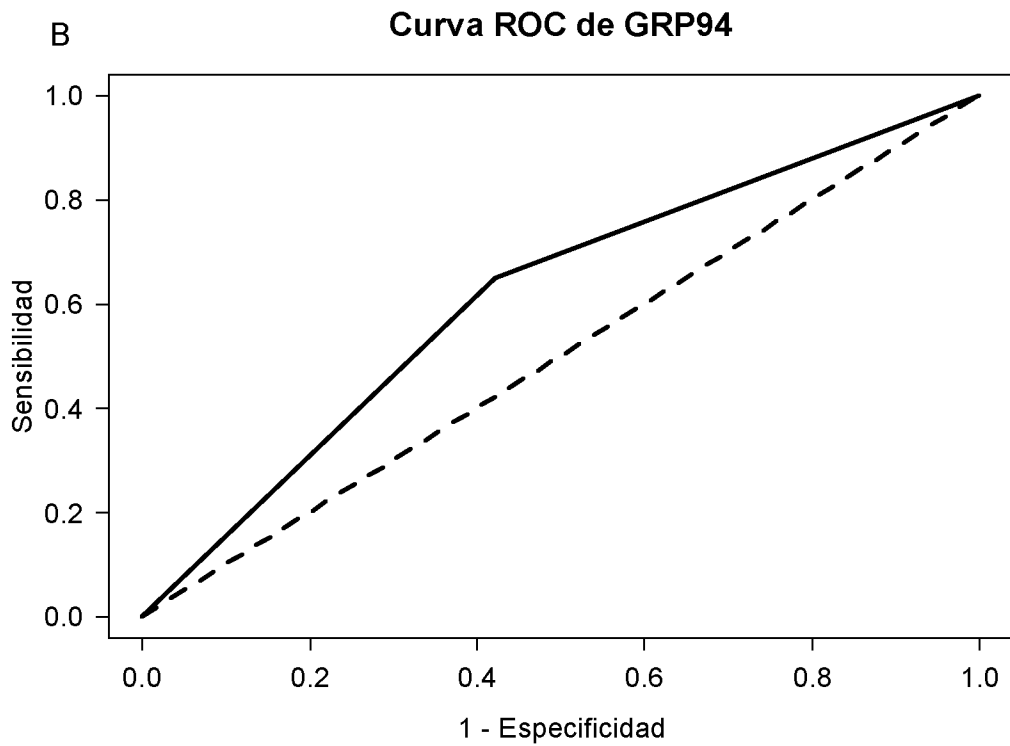
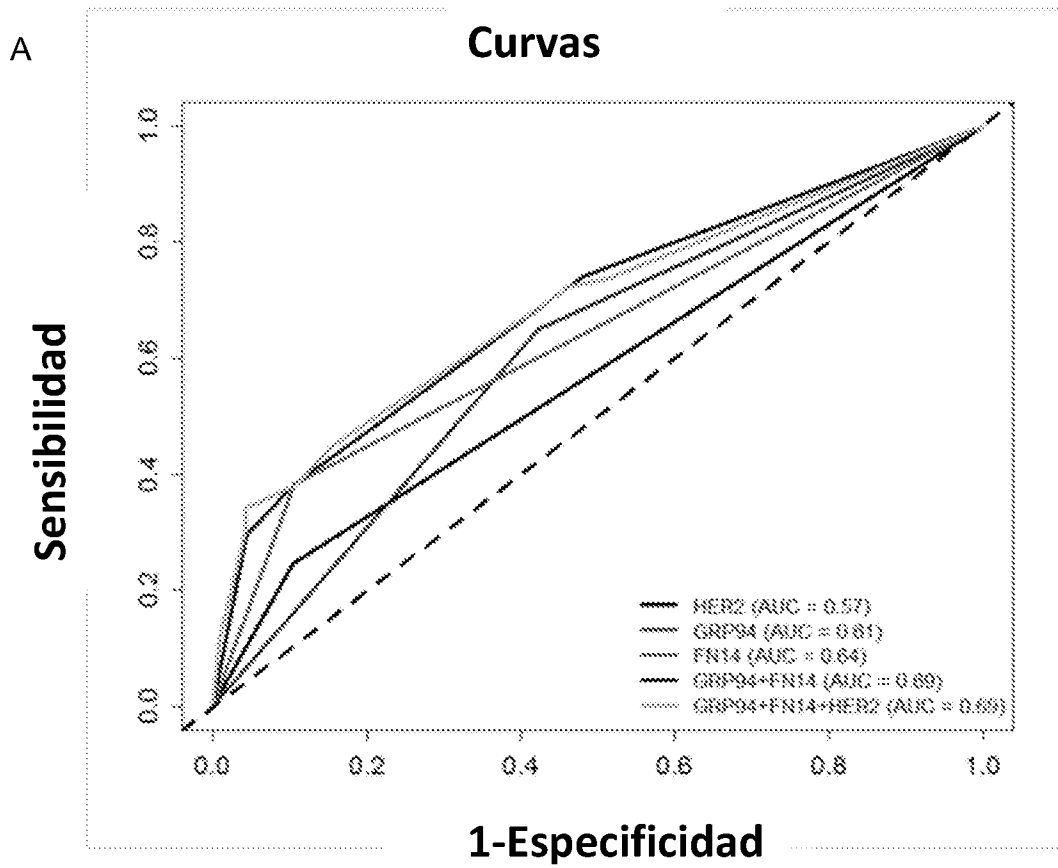


FIGURA 4

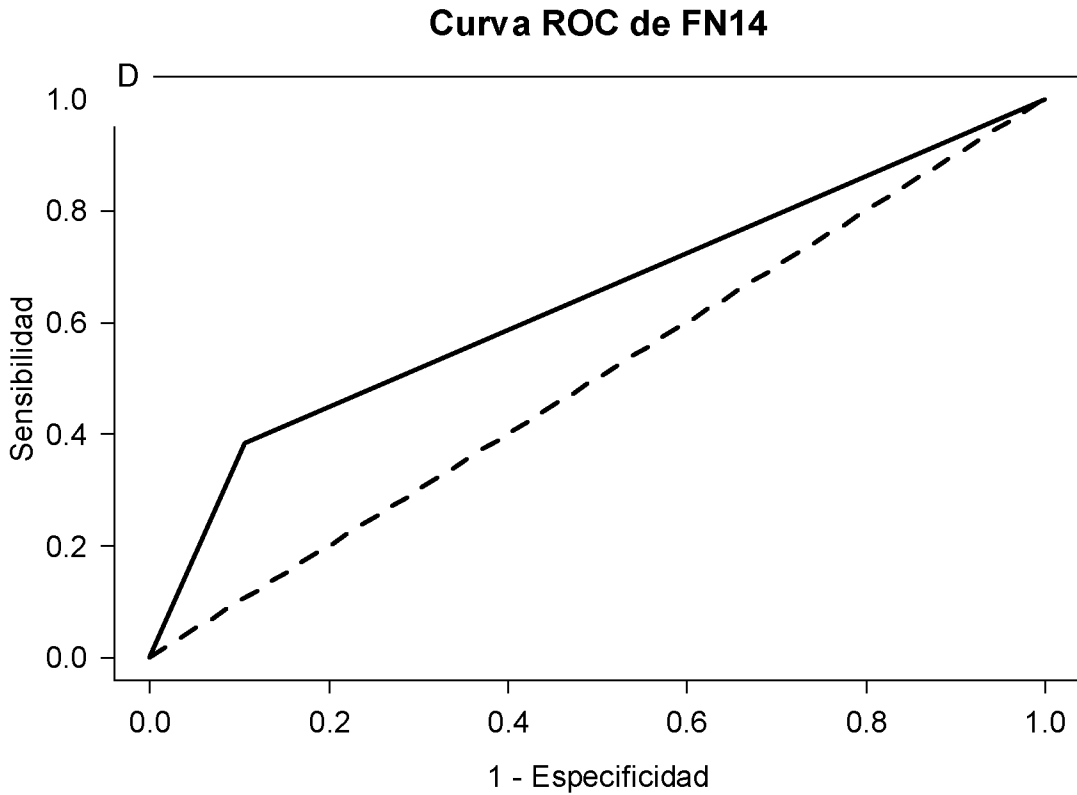
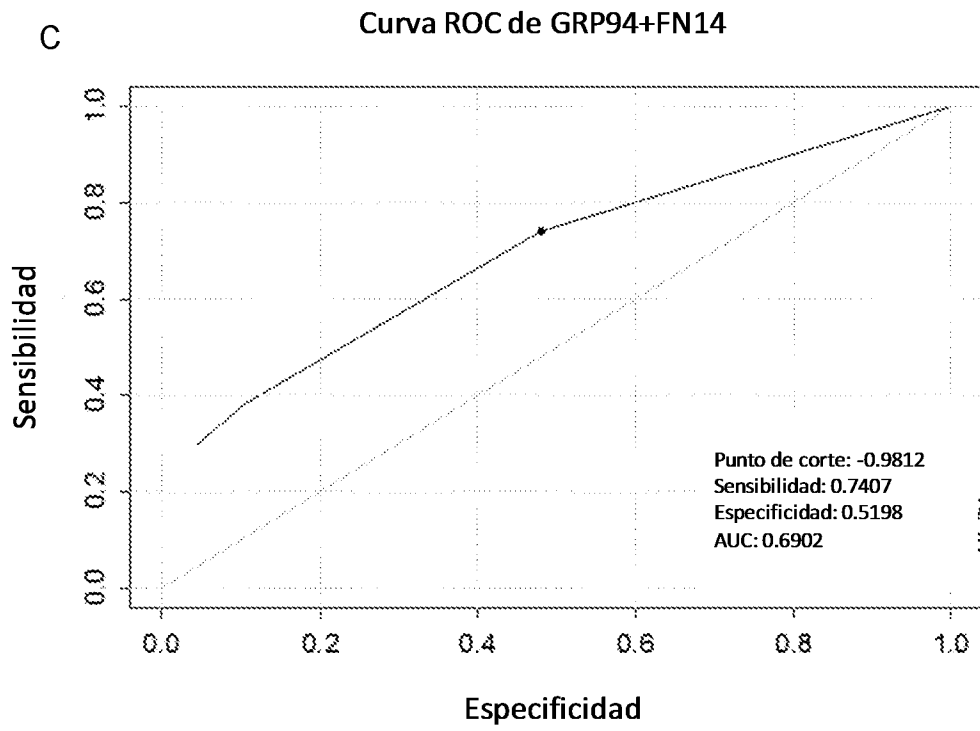
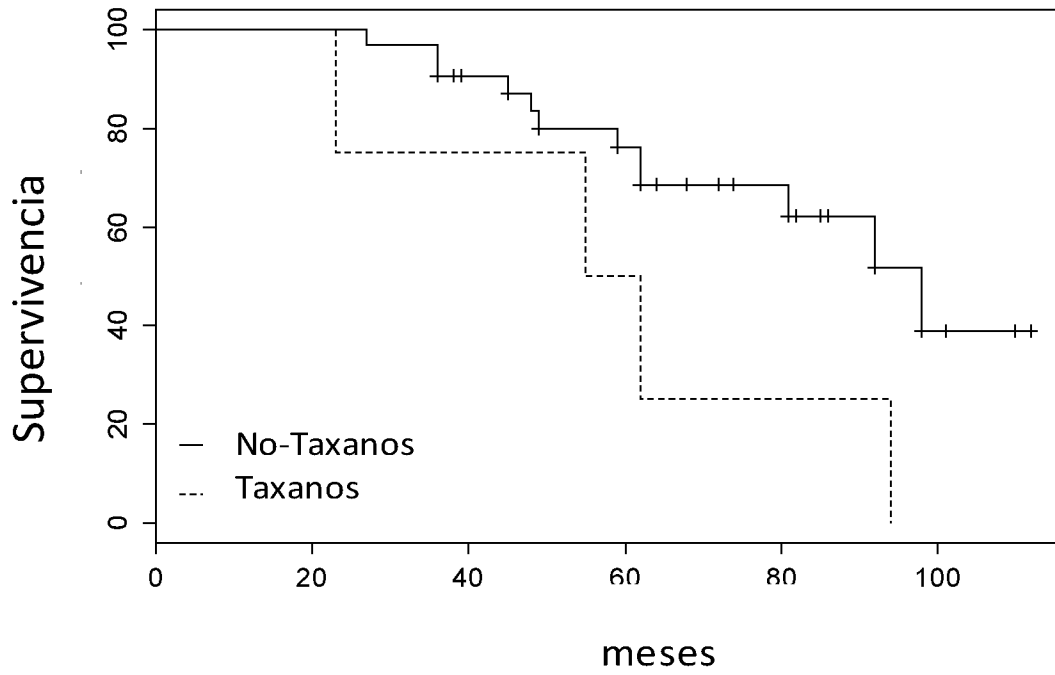


FIGURA 4 (Cont.)

### FN14 +



### FN14 -

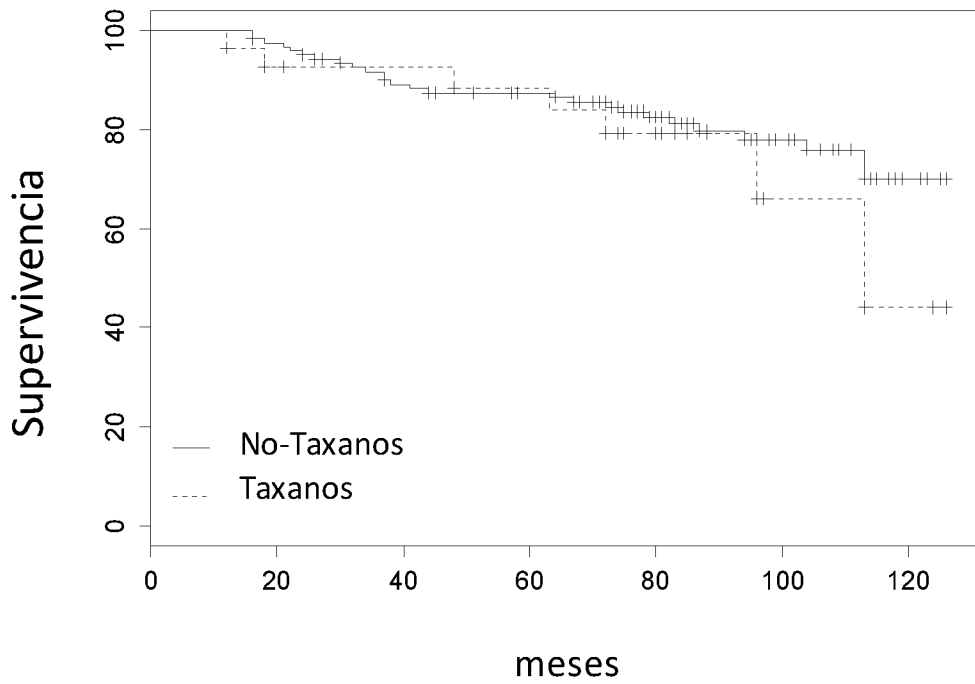


FIGURA 5

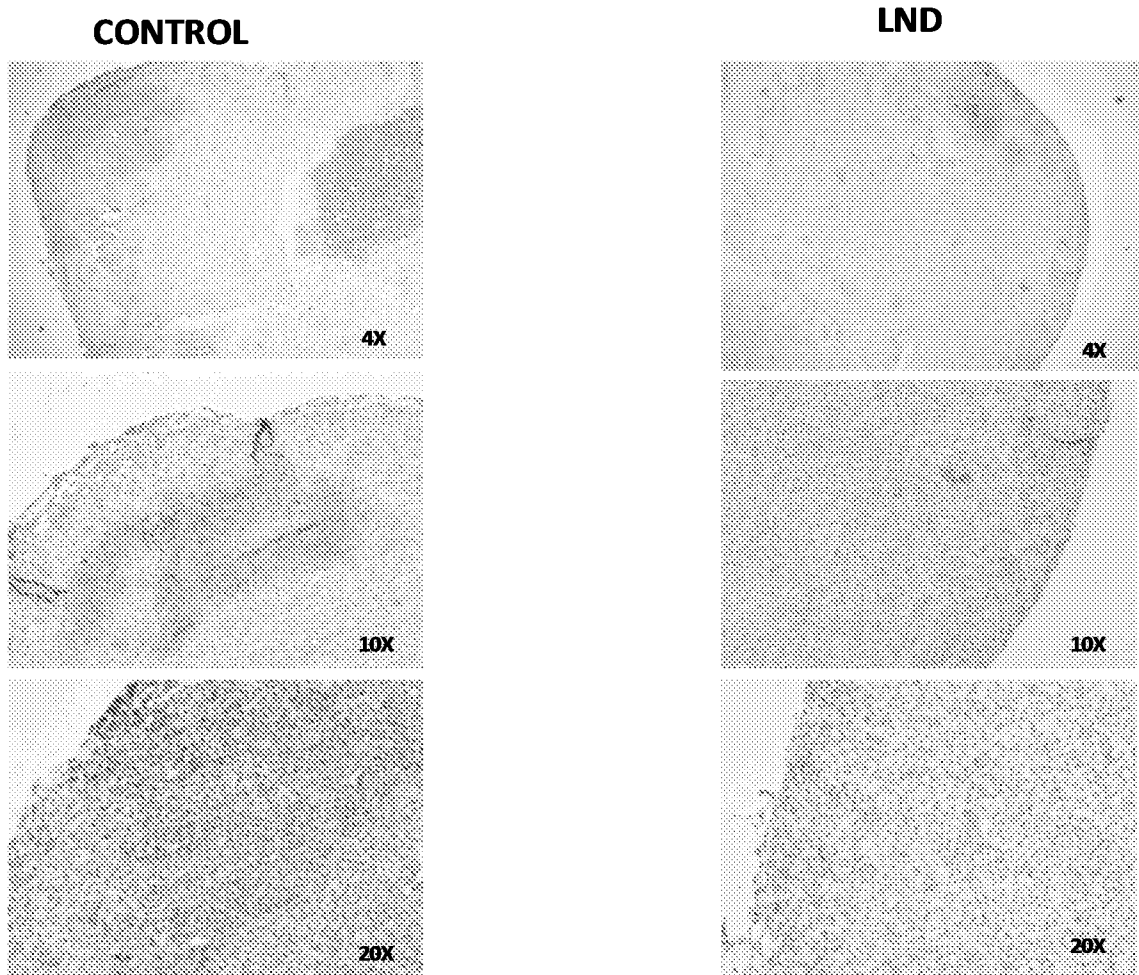


FIGURA 6

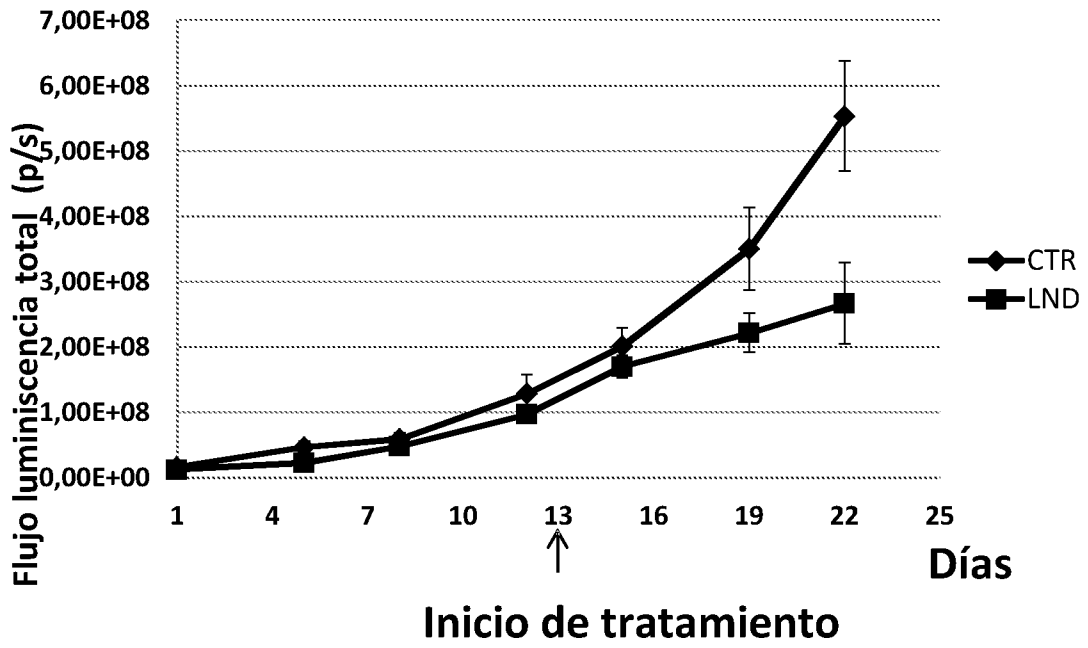


FIGURA 7