

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 191**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2010 PCT/EP2010/059321**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2017 WO2011000891**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2010 E 10731498 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2449133**

54 Título: **Método para someter a prueba a un sujeto que se cree que está predispuesto a presentar un cáncer metastásico que utiliza las isoformas delta133p53**

30 Prioridad:

**30.06.2009 EP 09305633  
30.06.2009 US 221769 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.02.2017**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.0%)  
3, rue Michel-Ange  
75016 Paris, FR;  
UNIVERSITY OF DUNDEE (33.0%) y  
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.0%)**

72 Inventor/es:

**ROUX, PIERRE;  
GADEA, GILLES;  
VINOT, STÉPHANIE;  
ANGUILLE, CHRISTELLE;  
BOURDON, JEAN-CHRISTOPHE y  
FERNANDES, KENNETH**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 601 191 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Método para someter a prueba a un sujeto que se cree que está predispuesto a presentar un cáncer metastásico que utiliza las isoformas delta133p53.

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para someter a prueba a un sujeto que se cree que está predispuesto a presentar un cáncer metastásico, preferentemente cáncer de mama o cáncer de colon.

10

**Antecedentes de la invención**

A pesar de los esfuerzos para mejorar el tratamiento y la gestión de los pacientes con cáncer, la supervivencia en los pacientes de cáncer no ha mejorado en las últimas dos décadas para muchos tipos de cáncer. Un evento crítico durante la tumorigénesis es la conversión de un tumor primario localizado, en una metástasis invasiva. La mayoría de los pacientes con metástasis mueren debido a ello. Sólo el 35% de los pacientes recién detectados no presentan metástasis.

15

El proceso invasivo es una consecuencia de las modificaciones morfológicas de las células que empieza con la pérdida de adhesividad debido a la alteración de las uniones epiteliales. Entonces, las células adquieren la habilidad de migrar a través del remodelado del citoesqueleto de actina, que involucra a la familia Rho de GTPasas pequeñas. Las células tumorales pueden utilizar dos modos de migración: la migración mesenquimal que requiere la dinámica de adhesión mediada por integrina y las proteasas superficiales para degradar la matriz extracelular (ECM), o la migración ameboide que es más eficaz y no requiere la digestión de la ECM o la adhesión mediada por integrina, pero involucra a la vía RhoA/ROCK. El supresor tumoral p53 evita la progresión del cáncer a invasividad al modular la motilidad celular mediada por Rho GTPasa.

20

25

La terapia óptima se basará en una combinación de información diagnóstica y de pronóstico. Una prueba diagnóstica precisa y reproducible es necesaria para proporcionar una evaluación del pronóstico que proporcionará información específica en relación con la supervivencia.

30

En el cáncer de mama, las variables clínicas y biológicas comúnmente utilizadas para predecir la supervivencia de los tratamientos quirúrgicos primarios son la invasión de nódulos linfáticos, grado histológico y expresión de receptor hormonal. Todos estos parámetros son factores de pronóstico y predictivos bien reconocidos.

35

Sin embargo, estas variables no permiten establecer un pronóstico específico y completo de supervivencia. De hecho, existe una heterogeneidad importante entre los pacientes que padecen del mismo tipo de cáncer de mama.

40

Por lo tanto, existe una necesidad existente de proporcionar marcadores adicionales que fortalezcan la predicción de supervivencia en pacientes con cáncer de mama.

45

Los biomarcadores son útiles en la biología para distinguir entre un estado médico normal y un estado patológico, o para evaluar la progresión de una patología. Las tecnologías que permiten la detección temprana del cáncer gracias a los biomarcadores deben ser muy beneficiosas en la búsqueda del cáncer y en las atenciones clínicas.

50

El interés de un marcador tumoral es para establecer, evaluar y validar la clasificación molecular de los tumores humanos, permitiendo así, desde el diagnóstico:

- evaluar mejor el potencial metastásico infralínico de los cánceres, por lo tanto evitando un sobretreatmento de los pacientes que presentan un riesgo bajo y por lo tanto permitiendo aislar a los pacientes que presenten un alto riesgo de evolución;
- pasar de una evaluación grupal a una evaluación personal, por lo tanto haciendo posible las terapias personalizadas;
- dirigir a los pacientes que presenten un alto riesgo de evolución y sin sensibilidad o casi sin sensibilidad a tratamientos convencionales para innovaciones terapéuticas; y
- permitir evaluar la eficacia de las moléculas terapéuticas alternativas.

55

60

El cáncer de mama afecta aproximadamente un millón de veces por año, y representa la forma más común de cáncer en mujeres, afectando aproximadamente al 10% de todas las mujeres en alguna etapa de sus vidas en el mundo occidental. Los hombres también pueden desarrollar cáncer de mama, aunque su riesgo es de menos de 1 en 1000.

65

La World Health Organization ha estimado que antes del 2010 los cánceres serán las primeras causas de mortalidad

mundialmente, antes que las enfermedades cardiovasculares. La última incidencia y datos de mortalidad en Francia muestran la misma evolución (Communication 2008 de Francim, el Institut de Veille Sanitaire, el Hospice Civils of Lyon y el Institut National du Cancer).

5 En los cánceres de mama, es esencial tratar a los pacientes dependiendo de la identidad biopatológica de su tumor. La meta es por lo tanto proporcionar factores predictivos fiables para seleccionar una quimioterapia dirigida, sólo para pacientes quimiosensibles y seleccionar fármacos específicos dependiendo del biomarcador específico del tumor. Por lo tanto, la eficacia de la quimioterapia depende de las características celulares y de la presencia de biomarcadores de sensibilidad, como los receptores hormonales, la expresión de UPA, PAI1, Her2 y la topoisomerasa II  $\alpha$ . El supresor tumoral p53 es el gen más mutado en los tumores humanos. Sin embargo, las mutaciones que afectan al gen p53 deben interpretarse cuidadosamente, en particular dado que su valor predictivo depende de los tipos de cáncer de mama.

15 Los inventores han descubierto que el patrón de expresión de isoformas de un supresor tumoral p53 debido a un empalme aberrante, está asociado con un mal pronóstico.

20 En otras palabras, los inventores han identificado marcadores que están asociados específicamente con cánceres metastásicos. En consecuencia, estas isoformas p53 permiten diferenciar a los cánceres metastásicos de los cánceres no metastásicos.

25 La presente invención se refiere a un método para someter a prueba a un sujeto que se cree que está predispuesto a presentar un cáncer que comprende la etapa de i) analizar una muestra biológica de dicho sujeto para detectar la presencia de una isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ , siendo la presencia de dicha isoforma p53 indicativa de cáncer, preferentemente de un cáncer metastásico.

30 En una forma de realización particular, la presencia de una isoforma p53 corresponde a la determinación del nivel de expresión de la isoforma p53.

35 La presencia de las isoformas p53 pueden evaluarse detectando un polipéptido de la isoforma p53 o un fragmento del mismo, o detectando un ARNm de la isoforma p53 o un fragmento del mismo.

40 Además, dicho método puede incluir una etapa adicional para comparar el nivel de expresión detectado de la isoforma p53 con un valor de umbral. Dicho valor de umbral puede corresponder a un control positivo o negativo.

45 Por ejemplo, un control negativo puede ser el nivel de expresión de la isoforma p53 de un sujeto que presente un cáncer no metastásico o el nivel de expresión de la isoforma p53 de un sujeto sano.

50 Preferentemente, un nivel de expresión más elevado que un control negativo será indicativo de un cáncer metastásico.

55 Por ejemplo, un control positivo puede ser el nivel de expresión de la isoforma p53 de un sujeto que presente cáncer metastásico.

60 Preferentemente, los métodos de acuerdo con la invención son los métodos *in vitro*.

65 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para medir la agresividad del cáncer en un sujeto, que comprende la etapa de i) determinar la presencia de una isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$  en una muestra biológica del sujeto, siendo la presencia de dicha isoforma indicativa de un cáncer agresivo, preferentemente siendo dichas isoformas indicativas de un cáncer metastásico.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para determinar la respuesta del sujeto a una terapia del cáncer antimetastásica, recibiendo o habiendo recibido dicho sujeto una terapia para un estado asociado con el cáncer, que comprende la etapa de:

55 i) determinar si la isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en  $\Delta 133p53\beta$ ,  $\Delta 133p53$  y  $\Delta 133p53\gamma$  se encuentra presente o no en una muestra biológica seleccionada de entre el grupo que consiste en médula ósea, suero, plasma, sangre, linfa o células de tejido canceroso o presuntamente canceroso o tejido adyacente del mismo del sujeto.

60 ii) comparar un nivel de expresión de una de las tres isoformas p53 como se ha mencionado anteriormente con un valor umbral.

65 Dicho valor de umbral puede corresponder a un control positivo o negativo como se definió anteriormente, o al nivel de expresión medido en una muestra de un sujeto antes de que dicho sujeto haya recibido terapia.

Preferentemente, este método incluye un paso adicional de determinar si el sujeto responde a la terapia.

Por ejemplo, la presencia de dicha isoforma es indicativa de la respuesta del sujeto a la terapia cuando el nivel de expresión de dicha isoforma p53 es más bajo que el nivel de expresión medido en una muestra del sujeto antes de que dicho sujeto haya recibido terapia. Alternativamente, la presencia de dicha isoforma p53 es indicativa de la respuesta del sujeto a la terapia cuando el nivel de expresión de dicha isoforma p53 es igual o inferior al nivel de expresión medido en una muestra de un sujeto que no presenta cáncer.

Puede usarse el método anterior de la invención en combinación con otros métodos de diagnóstico o pronóstico de cáncer.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "isoforma p53" se refiere a un polipéptido o a un ARNm que difiere del polipéptido p53 de secuencia SEC ID n°: 7 o del ARNm de p53 que presenta una secuencia de ADNc SEC ID n°: 8 respectivamente, debido a un error de corte y empalme. La isoforma p53 de la presente invención se selecciona en el grupo que consiste en  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ .

Preferentemente, dicha isoforma p53 es  $\Delta 133p53\beta$ .

Preferentemente, el polipéptido  $\Delta 133p53\beta$  está representado por la secuencia SEC ID n°:1, y el ARNm de  $\Delta 133p53\beta$  presenta una secuencia de ADNc SEC ID n°:2.

Preferentemente, el polipéptido  $\Delta 133p53$  está representado por la secuencia SEC ID n°: 3 y el ARNm de  $\Delta 133p53$  presenta una secuencia de ADNc SEC ID n°:4.

Preferentemente,  $\Delta 133p53\gamma$  está representado por la secuencia SEC ID n°: 5 y el ARNm de  $\Delta 133p53\gamma$  ARNm presenta una secuencia de ADNc SEC ID n°: 6.

El "cáncer" incluye un neoplasma maligno caracterizado por un crecimiento celular desregulado o descontrolado. El término "cáncer" incluye tumores primarios malignos (por ejemplo, aquellos cuyas células no han migrado a sitios en el cuerpo del sujeto diferentes al sitio del tumor original) y tumores malignos secundarios (por ejemplo, aquellos que surgen de metástasis, la migración de células tumorales a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

En los métodos de la presente invención, el cáncer metastásico se selecciona preferentemente de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovarios, cánceres digestivos y cáncer de garganta, particularmente de sujetos humanos, siendo el más preferido el cáncer de mama o un cáncer de colon e incluso más preferentemente un cáncer de mama.

El término proceso de empalme consiste en eliminar los intrones en los ARN premensajeros para producir unos ARN mensajeros maduros que puedan usarse mediante el mecanismo de translación de la célula (SHARP, Cell, vol. 77, p. 805-815, 1994). En el caso de empalme alternativo, el mismo precursor puede ser la fuente de los ARN mensajeros que codifican proteínas con distintas funciones (BLACK, Annu. Rev. Biochem. Vol. 72, p. 291-336, 2003).

"Defecto de empalme" significa un proceso de empalme anormal que puede llevar a la formación de isoformas anormales.

El término "agresivo" (o "invasivo") como se utiliza en la presente memoria en relación con el cáncer se refiere a la proclividad de un tumor para expandirse más allá de sus fronteras a tejidos adyacentes, o a la característica del tumor en relación con metástasis. El cáncer invasivo puede contrastarse con el cáncer confinado a un órgano. Por ejemplo, un carcinoma de células basales de la piel no es un tumor no invasivo o mínimamente invasivo, confinado al sitio del tumor primario y que se expande en tamaño, pero no formando metástasis. En contraste, el cáncer melanoma es altamente invasivo de los tejidos adyacentes y distales. La propiedad invasiva de un tumor con frecuencia va acompañada de la elaboración de enzimas proteolíticas, tales como las colagenasas, que degradan el material de la matriz y el material de la membrana basal para permitir que el tumor se expanda más allá de los confines de la cápsula; y más allá de los confines del tejido particular en el que se encuentra el tumor.

El término "metástasis" o "metastásico" como se usa en la presente memoria se refiere al estado de diseminación del cáncer desde el órgano de origen a sitios distales adicionales en el paciente. El proceso de la metástasis de tumores es un evento de etapas múltiples que implica la invasión local y destrucción de la matriz intercelular, intravasación en los vasos sanguíneos, canales linfáticos u otros de transportación, supervivencia en la circulación, extravasación fuera de los vasos en el sitio secundario y crecimiento en el nuevo lugar.

El término "sujeto" incluye a los mamíferos, por ejemplo, humanos, perros, vacas, caballos, canguros, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales transgénicos no humanos, preferentemente el sujeto humano, y más preferentemente una mujer.

El término "muestras biológicas" incluye muestras sólidas y de fluido corporal. Las muestras biológicas de la presente invención pueden incluir células, proteína, sangre o fluidos biológicos, tales como médula ósea, líquido ascítico o fluido cerebral (por ejemplo, fluido cerebroespinal). Los ejemplos de muestras sólidas biológicas incluyen las muestras tomadas de heces, el recto, sistema nervioso central, hueso, tejido de mama, tejido renal, cuello uterino, endometrio, cabeza/cuello, vesícula biliar, tejido parotídeo, próstata, cerebro, hipófisis, tejido renal, músculo, esófago, estómago, intestino delgado, colon, hígado, bazo, páncreas, tejido tiroideo, tejido cardíaco, tejido pulmonar, vejiga, tejido adiposo, tejido de nódulo linfático, útero, tejido de los ovarios, tejido suprarrenal, tejido testicular, amígdalas y timo. Los ejemplos de "muestras de fluido corporal" incluyen las muestras tomadas de: la sangre, suero, semen, fluido prostático, fluido seminal, orina, saliva, esputo, mucosidad, médula ósea, linfa y lágrimas. Las muestras para uso en los ensayos de invención pueden obtenerse por métodos estándares incluyendo punciones venosas y biopsias quirúrgicas. En una forma de realización, la muestra biológica es una muestra de tejido mamario obtenido mediante biopsia por punción.

Se selecciona la muestra biológica usada en los métodos de la presente invención a partir del grupo que consiste en médula ósea, suero, plasma, sangre, linfa o células del tejido canceroso o canceroso sospechoso o tejido adyacente al mismo, preferentemente una muestra de médula ósea.

El término "nivel de expresión" o "nivel" significa la concentración de un producto de expresión, por ejemplo, un polipéptido o ARNm, en una muestra.

Como se describe con mayor detalle a continuación, se pueden usar los métodos de detección de la invención para detectar el ARNm de una isoforma p53 de la presente invención, el polipéptido de una isoforma p53 de la presente invención o fragmentos específicos de la misma, en una muestra biológica *in vitro*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de dicho ARNm de la isoforma p53 incluyen las hibridaciones del norte y las hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de la isoforma p53, y más específicamente el polipéptido  $\Delta 133p53\beta$ , incluye la inmunohistoquímica, PCR cuantitativo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencia Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere a los métodos de acuerdo con la presente invención, en los que la isoforma p53 es  $\Delta 133p53\beta$ .

Cuando los métodos de acuerdo con la presente invención se basan en la detección o la cuantificación de un ARNm de isoforma p53, también se prefiere que la determinación de la presencia de dicho ARNm comprenda una etapa adicional de:

amplificación de dicho ARNm o ADNc de la isoforma p53, la secuencia complementaria de los mismos, o un fragmento de los mismos que presenta una longitud de por lo menos 10 nucleótidos que sea específica de dicha isoforma p53.

Tal y como se emplea en la presente memoria, el término "ARNm" se refiere a un ARNm maduro, es decir, que ya haya pasado por el evento de empalme.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "ADNc" deberá referirse a la copia de DNA del ARNm.

Es asimismo preferido que se realice la etapa de amplificación del ARNm o ADNc de  $\Delta 133p53\beta$  por medio de una reacción PCR o RT-PCR.

La presente detección puede lograrse aislando el ARNm de una muestra. Al usar la detección del ARNm, el método puede realizarse convirtiendo el ARNm en ADNc de acuerdo con métodos estándares; tratando el ADNc convertido con reactivos de reacción de amplificación (tales como los reactivos de reacción PCR de ADNc) en un recipiente junto con una mezcla apropiada de cebadores de ácido nucleico; haciendo reaccionar el contenido del recipiente para producir productos de amplificación; analizando los productos de amplificación para detectar la presencia de un ácido nucleico específico de una isoforma p53 de la invención presente en la muestra biológica.

Preferentemente, dichos cebadores presentan la secuencia SEC ID nº: 9 y SEC ID nº: 10.

El término "cebador", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un oligonucleótido, ya sea que ocurra naturalmente (como en una digestión de restricción purificada) o producido sintéticamente, y que puede iniciar la síntesis de una cadena complementaria a un ácido nucleico cuando se coloca bajo unas condiciones apropiadas, es decir, en la presencia de nucleótidos y un agente de inducción, tales como: la polimerasa de ADN, y a una temperatura y pH apropiados. El cebador puede ser de una cadena o de doble cadena y debe ser suficientemente largo para preparar la síntesis del producto de extensión deseada en la presencia del agente de inducción. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluyendo temperatura, secuencia y/o homología del cebador y del método usado. Por ejemplo, en aplicaciones diagnósticas, el cebador del oligonucleótido por lo general contiene de 10 a 25 o más nucleótidos, dependiendo de la complejidad de la secuencia meta, aunque puede

contener menos nucleótidos.

Se seleccionan los cebadores en la presente memoria para ser "sustancialmente" complementarios a secuencias particulares de ADN diana. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridar con sus respectivas cadenas. Por lo tanto, la secuencia del cebador no necesita reflejar la secuencia exacta de la plantilla. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario (es decir, que contenga un sitio de restricción) puede adjuntarse al extremo 5' del cebador, con el resto de la secuencia del cebador siendo complementaria para la cadena. Alternativamente, las bases no complementarias o secuencias más largas pueden estar intercaladas en el cebador, siempre y cuando la secuencia del cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia para hibridarse con la misma y formar la plantilla para la síntesis del producto de extensión.

"Amplificación" se refiere a los procesos dependientes de la plantilla y a la propagación mediada por el vector que dan como resultado un incremento en la concentración de una molécula específica de ácido nucleico relativa a su concentración inicial, o en un incremento en la concentración de una señal detectable. Tal y como se utilizan en la presente memoria, el término proceso dependiente de la plantilla tiene como objetivo referirse a un proceso que involucra a la extensión dependiente de la plantilla de la molécula del cebador.

El término proceso dependiente de la plantilla se refiere a la síntesis del ácido nucleico de una molécula de ARN o ADN en el que se dicta la secuencia de la cadena recién sintetizada de ácido nucleico por las reglas bien conocidas de apareamiento de bases complementarias (véase, por ejemplo, Watson, J. D. *et al.*, In: Molecular Biology of the Gene, 4ª Ed., W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif (1987). Por lo general, las metodologías mediadas por vector involucran la introducción del fragmento de ácido nucleico en un vector de ADN o ARN, la amplificación clonal del vector y la recuperación del fragmento de ácido nucleico amplificado. Se proporcionan ejemplos de tales metodologías en: Maniatis T. *et al.*, Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

Existe un número de procesos dependientes de plantilla disponible para amplificar las secuencias diana de interés presentes en una muestra. Uno de los métodos de amplificación mejor conocidos es la reacción en cadena de polimerasa (PCR) la cual se describe en detalle en Mullis *et al.*, patente US nº 4.683.195, Mullis *et al.*, patente US nº 4.683.202, y Mullis *et al.*, patente US nº 4.800.159, y en Innis *et al.*, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego Calif, 1990. En breve, en la PCR, se preparan dos secuencias de cebador las cuales son complementarias con regiones en cadenas complementarias opuestas de la secuencia diana. Se agrega un exceso de desoxinucleósido trifosfatos a una mezcla de reacción junto con una polimerasa de ADN (por ejemplo, Taq polimerasa). Si la secuencia diana está presente en una muestra, los cebadores se unirán al objetivo y la polimerasa hará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia objetivo agregando nucleótidos. Elevando y bajando la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se disociarán del objetivo para formar productos de reacción, los cebadores en exceso se unirán al objetivo y a los productos de reacción y el proceso se repite. Preferentemente, se puede realizar un procedimiento de amplificación de PCR de transcriptasa inversa para cuantificar la cantidad de ARNm amplificada. Las metodologías de reacción en cadena de polimerasa son bien conocidas por los expertos en la materia.

Incluso pueden usarse otros métodos de amplificación descritos en la solicitud de GB nº 2 202 328, y en la solicitud PCT nº PCT/US 89/01025 de acuerdo con la presente invención. En la solicitud anterior, se usan cebadores "modificados" en una síntesis tipo PCR, dependiente de plantilla y de enzimas. Se pueden modificar los cebadores por medio de un marcado con una fracción de captura (por ejemplo, biotina) y/o una fracción de detector (por ejemplo, enzima). En la última solicitud, se agrega un exceso de sondas marcadas a una muestra. En la presencia de la secuencia diana, la sonda se une y catalíticamente se hace un clivaje. Después del clivaje, se libera intacta la secuencia diana para ser unida por sonda en exceso. El clivaje de la sonda marcada señala la presencia de la secuencia diana.

Después de la amplificación, puede detectarse la presencia del producto de la amplificación. El producto amplificado puede secuenciarse por medio de cualquier método conocido por un experto en la materia.

En otra forma de realización, la invención se refiere a los métodos de acuerdo con la presente invención, en los que se realiza la determinación de la presencia de una isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$  por una sonda que puede hibridar específicamente con dicho ARNm de la isoforma p53, secuencia complementaria de la misma o un fragmento de la misma que presenta por lo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más longitud de nucleótidos que es específica de dicha isoforma p53, preferentemente hibridando con el ARNm humano de  $\Delta 133p53\beta$ , e incluso más preferentemente con ARNm de  $\Delta 133p53\beta$  que presenta la secuencia SEC ID nº: 2.

Ventajosamente, se selecciona la sonda en el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº: 9, SEC ID nº: 10 o SEC ID nº: 11, preferentemente la secuencia SEC ID nº: 11.

En una forma de realización particular, la invención se refiere a los métodos de acuerdo con la presente invención, en los que se realiza la determinación de la presencia del ARNm de la isoforma p53, más particularmente el ARNm de  $\Delta 133p53\beta$ , por el siguiente método que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una sonda de ácido nucleico específica de una isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ , bajo unas condiciones de hibridación con la muestra de prueba biológica que comprende, ya sea:

- unas moléculas de ARN aisladas de una muestra biológica del sujeto humano, en el que se sospecha que la muestra biológica contiene células tumorales, o

- unas moléculas de ácido nucleico sintetizadas a partir de moléculas de ARN aisladas como ADNc,

en el que la sonda de ácido nucleico presenta un secuencia de nucleótido que comprende ya sea un fragmento de longitud de por lo menos 15 nucleótidos de la secuencia de la isoforma p53, o un fragmento de la misma, o su complemento, y

(b) detectar la formación de híbridos de la sonda de ácido nucleico y la muestra de prueba,

en el que la presencia de híbridos indica la presencia de células tumorales en el tejido obtenido del sujeto humano.

Las sondas basadas en la secuencia de una molécula de ácido nucleico de la invención pueden usarse para detectar transcripciones correspondientes al ARNm de la isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ . La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o un fragmento del mismo, tal como un oligonucleótido que presente la suficiente longitud para hibridar específicamente bajo condiciones estrictas al ARNm de la isoforma p53 de la invención. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que se está expresando el marcador en cuestión. En una forma de realización, la sonda incluye un grupo de marca adjunta a la misma, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor de una enzima.

En un formato, se inmoviliza el ARNm sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo al extender el ARNm aislado sobre un gel de agar y transferir el ARNm del gel a una membrana, tal como de nitrocelulosa. En un formato alternativo, se inmoviliza(n) la(s) sondas sobre una superficie sólida y se pone en contacto el ARNm con la(s) sonda(s), por ejemplo en una matriz de chip de gen Affymetrix. Un experto en la materia, fácilmente puede adaptar métodos conocidos de detección de ARNm para la utilización en la detección del nivel de expresión del ARNm codificado por los marcadores de la presente invención.

Cuando se basan los métodos de acuerdo con la presente invención en la detección o la cuantificación de un nivel de expresión de polipéptido de la isoforma p53, también se prefiere que la determinación de la presencia, de dicha isoforma p53 por medio de un método inmunohistoquímico o de inmunoensayo usando un anticuerpo que puede reconocer específicamente dicha isoforma p53.

En una forma de realización, se realiza la determinación de la presencia de la isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$  poniendo en contacto la muestra biológica con un anticuerpo específico de la isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en polipéptido de  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ , o un fragmento del mismo, y determinando la unión del anticuerpo a la muestra biológica.

El "anticuerpo" incluye las moléculas de inmunoglobulina y los determinantes activos inmunológicamente de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión del antígeno (epítipo) que específicamente se une (inmunorreacciona con) un antígeno. Se encuentra la especificidad de la unión en el conjunto grande y diverso de anticuerpos en la variable (V) determinante de las cadenas H y L. El anticuerpo incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, inmunoglobulinas completas y fragmentos de unión a antígeno de las inmunoglobulinas.

Se localizan los sitios de unión de las proteínas que comprenden un anticuerpo, es decir, funciones de unión de antígeno del anticuerpo por medio del análisis de los fragmentos de un anticuerpo que ocurren naturalmente. Por lo tanto, los fragmentos de unión de antígeno también tienen por objetivo designarse con el término "anticuerpo". Algunos ejemplos de los fragmentos de unión incluidos dentro del término anticuerpo, incluyen: un fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y Cm; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; una región de determinación de complementariedad aislada (CDR); y un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab' enlazados por un puente de bisulfuro en la región bisagra. Se obtienen estos fragmentos de anticuerpos usando técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia, y se tamizan los fragmentos para utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. El término "anticuerpo" además tiene por objetivo incluir a moléculas biespecíficas y quiméricas que tengan por lo menos una determinante de unión de antígeno derivada de la molécula de un anticuerpo.

En los ensayos de diagnóstico y de pronóstico de la invención, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o

anticuerpo monoclonal, y se prefieren los anticuerpos monoclonales.

Preferentemente, dicho anticuerpo es marcado.

5 Se producen los anticuerpos inmunizando a animales, por lo general a mamíferos, por medio de múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de un inmunógeno (antígeno) y un adyuvante, según resulte apropiado. Como una forma de realización ilustrativa, por lo general se inmunizan los animales contra una proteína, péptido o derivado al combinar aproximadamente de 1 µg a 1 mg de proteína que puede producir una respuesta inmunitaria, junto con una preparación de transportador de mejoramiento, tales como: el adyuvante completo de Freund, o un agente agregante tales como alumbre, e inyectando la composición de manera intradérmica en múltiples sitios. Los animales posteriormente reciben un refuerzo de por lo menos una administración subsecuente de una cantidad menor, como de 1/5 a 1/10 de la cantidad original del inmunógeno en el adyuvante incompleto de Freund (u otro adyuvante apropiado) por inyección subcutánea en sitios múltiples. Posteriormente, los animales se sangran, se hace un ensayo de suero para determinar la titulación específica del anticuerpo, y nuevamente reciben los animales el refuerzo y se realiza el ensayo hasta que la valoración del anticuerpo ya no se incrementa (es decir, meseta).

20 Tales poblaciones de moléculas de anticuerpos son denominadas "policlonales" ya que la población comprende un conjunto grande de anticuerpos cada uno de los cuales es específico para uno de los muchos epítomos que difieren y se encuentran en el inmunógeno, y cada uno de los cuales se caracteriza por una afinidad específica para ese epítomo. Un epítomo es el determinante más pequeño de antigenicidad, el cual para una proteína puede comprender un péptido de seis a ocho residuos de longitud (Berzofsky J. y 1. Berkower (1993) en Paul, W., Ed., *Fundamental Immunology*, Raven Press, N. Y., p. 246). Las afinidades varían de bajas, es decir,  $10^{-6}$  M, a altas, es decir,  $10^{-11}$ .

25 Se aísla la fracción del anticuerpo policlonal obtenido del suero de un mamífero por medio de técnicas bien conocidas, por ejemplo, por cromatografía con una matriz de afinidad que selectivamente une moléculas de inmunoglobulina tales como la proteína A, para obtener la fracción IgG. Para mejorar la pureza y especificidad del anticuerpo, los anticuerpos específicos pueden purificarse adicionalmente por medio de la cromatografía de inmunoafinidad usando el inmunógeno fijado en fase sólida. Se contacta el anticuerpo con el inmunógeno fijado en fase sólida durante un periodo de tiempo suficiente para que el inmunógeno reaccione inmunológicamente con las moléculas del anticuerpo para formar un inmunocompleto fijado en fase sólida. Los anticuerpos unidos se eluyen de la fase sólida por medio de técnicas estándares, tales como el uso de soluciones amortiguadoras de pH decreciente o fuerza iónica en aumento, se realiza la prueba de las fracciones eluidas y se combinan aquellas que contienen anticuerpos específicos.

35 El "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión sencilla por un epítomo particular. Se pueden preparar los anticuerpos monoclonales usando una técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por medio del crecimiento continuo de células en cultivo. Incluyen de manera no limitativa la técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975, *Nature*, 256: 495-497; también véase Brown *et al.*, 1981, *J. Immunol.*, 127:539-46; Brown *et al.*, 1980, *J. Biol. Chem.*, 255:4980-83; Yeh *et al.*, 1976, *PNAS* 76:2927-31; y Yeh *et al.*, 1982, *Int. J. Cancer*, 29:269-75) y la técnica más reciente de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor *et al.*, 1983, *Immunol. Today* 4:72), técnica EBV-hibridoma (Cole *et al.*, 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96), y técnicas trioma. Es bien conocida la tecnología para producir hibridomas (véanse generalmente *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* ed., John Wiley & Sons, New York, 1994). Se detectan las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención por medio de cribado de los sobrenadantes de cultivo de hibridoma para los anticuerpos que unen el polipéptido de interés, por ejemplo, usando una prueba ELISA estándar.

50 Puede producirse un anticuerpo monoclonal por medio de las etapas siguientes. En todos los procedimientos, se inmuniza un animal con un antígeno tal como una proteína (o péptido de la misma) como se describe anteriormente para la preparación de un anticuerpo policlonal. La inmunización por lo general se logra administrando el inmunógeno a un mamífero inmunológicamente competente en una cantidad inmunológicamente efectiva, es decir, una cantidad suficiente para producir una respuesta inmunitaria. Preferentemente, el mamífero es un roedor tal como un conejo, rata o ratón. Entonces, el mamífero se mantiene en un programa de refuerzos durante un periodo de tiempo suficiente para que el mamífero genere moléculas de anticuerpos de alta afinidad como se ha descrito. Después de un tiempo suficiente para generar anticuerpos de alta afinidad, el animal (por ejemplo, un ratón) es sacrificado y se obtienen los linfocitos que producen anticuerpos de uno o más de los nódulos linfáticos, bazo y sangre periférica. Se prefieren las células del bazo, y pueden separarse mecánicamente en células individuales en un medio fisiológico usando métodos bien conocidos por un experto en la materia. Se immortalizan las células productoras de anticuerpos por medio de fusión a células de una línea de mieloma de ratón.

65 Los linfocitos de ratón dan un alto porcentaje de fusiones estables con mielomas homólogos de ratón, sin embargo también pueden usarse las células somáticas de rata, conejo y rana. Se immortalizan las células de bazo de los animales deseados que producen anticuerpos por medio de la fusión con células de mieloma, generalmente en presencia de un agente de fusión tal como: glicol de polietileno. Se puede usar cualquier número de líneas celulares

de mieloma apropiadas como un socio de fusión con técnicas estándares, por ejemplo las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14, disponibles a partir de la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD.

- 5 Se cultivan las células producto de la fusión, que incluyen los hibridomas deseados, en un medio selectivo tal como: medio HAT, diseñado para eliminar las células de linfocito o bazo de mieloma parental no fusionadas. Se seleccionan las células de hibridoma y se hacen crecer bajo condiciones de dilución limitante para obtener clones aisladas. Se criban los sobrenadantes de cada hibridoma clonal para la producción de anticuerpo de especificidad y afinidad deseados, por ejemplo, por técnicas de inmunoensayo para determinar el antígeno deseado tal como la  
 10 utilizada para la inmunización. Se aísla al anticuerpo monoclonal de los cultivos de células de producción por métodos convencionales, tales como: precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad (Zola *et al.*, Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques And Applications, Hurell (ed.), pp. 51-52, CRC Press, 1982).
- 15 Se pueden propagar los hibridomas producidos de acuerdo con estos métodos en cultivo *in vitro* o *in vivo* (en fluido ascítico) usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia.

Alternativo a la preparación de hibridomas de cribado de anticuerpos monoclonales, se puede identificar y aislar un anticuerpo monoclonal dirigido contra un polipéptido de la invención al cribar una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de exhibición de fagos de anticuerpos) con el polipéptido de interés. Los kits para generar y cribar bibliotecas de exhibición de fagos se encuentran comercialmente disponibles (por ejemplo, el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog nº 27-9400-01; y el Stratagene SutfZ4P Phage Display Kit, Catalog nº 240612). Adicionalmente, se pueden encontrar ejemplos de métodos y reactivos particularmente susceptibles para la utilización en la generación y cribado de una biblioteca de exhibición de anticuerpos en, por ejemplo: patente US nº 5.223.409; publicación PCT nº WO 92/18619; publicación PCT nº WO 91/17271; publicación PCT nº WO 92/20791; publicación PCT nº WO 92/15679; publicación PCT nº WO 93/01288; publicación PCT nº WO 92/01047; publicación PCT nº WO 92/09690; publicación PCT nº WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) Hum. Antibod. Hybridomas, 3:81-85; Huse *et al.* (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) EMBO J., 12: 725-734.

Adicionalmente, los anticuerpos recombinantes, tales como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden tanto las porciones humanas y no humanas que pueden realizarse usando técnicas estándares de ADN recombinante, se encuentran dentro del alcance de la invención. Se pueden producir tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados por medio de técnicas de ADN recombinante conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo usando métodos descritos en publicación PCT nº WO 87/02671; solicitud de patente europea 0 184 187; solicitud de patente europea 0 171 496; solicitud de patente europea 0 173 494; publicación PCT nº WO 86/01533; patente US nº 4.816.567; solicitud de patente europea 0 125 023; Better *et al.* (1988). El "anticuerpo marcado" como se usa en la presente memoria incluye los anticuerpos que están marcados por medios detectables e incluye los anticuerpos marcados enzimáticamente, radiactivamente, fluorescentemente, quimioluminescentemente y/o bioluminescentemente por medio de cualquiera de los muchos diferentes métodos conocidos por los expertos en la materia.

Una de las maneras en las que se puede marcar detectablemente a un anticuerpo es vinculando al mismo a una enzima. Esta enzima, a su vez, cuando se expone posteriormente a su sustrato, reaccionará con el sustrato de manera que produzca una fracción química que puede ser detectada, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que pueden usarse para marcar detectablemente un anticuerpo específico de la isoforma p53 incluyen de manera no limitativa malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-V-esteroide isomerasa, deshidrogenasa de alcohol de levadura, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, oxidasa de glucosa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-VI-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa.

Se puede lograr la detección usando una variedad de inmunoensayos. Por ejemplo, al marcar radiactivamente a un anticuerpo, es posible detectar al anticuerpo a través del uso de ensayos radioinmunitarios. Puede encontrarse una descripción de un ensayo radioinmunitario (RIA) en: Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, de Work T.S. *et al.*, North Holland Publishing Company, NY (1978), con una referencia particular al capítulo titulado: "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" de Chard T. El isótopo radioactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador gama o un contador de centelleo o por audiorradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles para el objetivo de la presente invención son: <sup>3</sup>H, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C y preferentemente <sup>125</sup>I.

Es asimismo posible marcar un anticuerpo con un compuesto fluorescente. Cuando se expone al anticuerpo marcado de manera fluorescente a la luz de la longitud de onda apropiada, entonces se puede detectar su presencia debido a fluorescencia. Entre los compuestos de marcado fluorescente más comúnmente usados se encuentran: fluoresceína isotiocianato, rodamina, ficoeriterina, ficocianina, alofocianina, oftaldeído y fluorescamina.

También se puede marcar detectablemente un anticuerpo usando metales de emisión de fluorescencia, tales como:  $^{152}\text{Eu}$ , u otros de la serie de lantanida. Estos metales pueden juntarse al anticuerpo usando tales grupos quelantes de metales como el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiamintetraacético (EDTA).

5 También puede marcarse detectablemente un anticuerpo al acoplarlo a un compuesto quimioluminiscente. Entonces se determina la presencia del anticuerpo marcado con un compuesto quimioluminiscente detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Algunos ejemplos de compuestos útiles de marcado quimioluminescentes son: luminol, luciferina, isoluminol, éster acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato.

10 De manera similar, se puede usar un compuesto bioluminiscente para marcar un anticuerpo de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia descubierta en los sistemas biológicos en los que una proteína catalítica incrementa la eficacia de la reacción quimioluminiscente. Se determina la presencia de una proteína bioluminiscente al detectar la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes importantes para el marcado son: luciferina, luciferasa y eucorina.

15 En los ensayos de detección utilizados en la invención, la cantidad de unión del anticuerpo a la muestra biológica puede determinarse por medio de la intensidad de la señal emitida por el anticuerpo marcado y/o por el número de células en la muestra biológica unida al anticuerpo marcado.

20 La detección del nivel de expresión de la isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en  $\Delta 133\text{p}53$ ,  $\Delta 133\text{p}53\gamma$  y  $\Delta 133\text{p}53\beta$  en una muestra biológica puede determinarse por medio de un radioinmunoensayo, un ensayo inmunorradiométrico y/o un inmunoensayo enzimático.

25 El "radioinmunoensayo" es una técnica para detectar y medir la concentración de un antígeno usando una forma marcada (es decir, marcada radioactivamente) del antígeno (es decir, polipéptido  $\Delta 133\text{p}53\beta$ ). Los ejemplos de las marcas radioactivas para los antígenos incluyen  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  y  $^{125}\text{I}$ . Se mide la concentración de la isoforma p53 en una muestra biológica haciendo que el antígeno en la muestra compita con un antígeno marcado (es decir, radioactivamente) para unir un anticuerpo a un antígeno. Para asegurar la unión competitiva entre el antígeno marcado y el antígeno no marcado, el antígeno marcado está presente en una concentración suficiente para saturar los sitios de unión del anticuerpo. A mayor concentración del antígeno en la muestra, menor será la concentración del antígeno marcado que se unirá al anticuerpo.

35 En un radioinmunoensayo, para determinar la concentración del antígeno marcado unido a un anticuerpo, debe separarse el complejo antígeno-anticuerpo del antígeno libre. Un método para separar el complejo antígeno-anticuerpo del antígeno libre es precipitando el complejo antígeno-anticuerpo con un antisero antiisotipo. Otro método para separar el complejo antígeno-anticuerpo del antígeno libre es precipitando el complejo antígeno-anticuerpo con *S. aureus* matado con formalina. Sin embargo, otro método para separar el complejo de antígeno-anticuerpo del antígeno libre es realizando un "radioinmunoensayo de fase sólida" en el que el anticuerpo está vinculado (es decir, covalentemente) a perlas de sefrosa, pozos de poliestireno, pozos de polivinilcloruro o pozos de microvaloración. Al comparar la concentración del antígeno marcado unido a anticuerpo con una curva estándar basada en muestras de concentración conocida de antígeno, se puede determinar la concentración de antígeno en la muestra biológica

45 Un "ensayo inmunorradiométrico" (IRMA) es un inmunoensayo en el que se marca el reactivo del anticuerpo de manera radioactiva. Un IRMA requiere la producción de un conjugado de antígeno multivalente por técnicas tales como: la conjugación a una proteína, por ejemplo, albúmina de suero de conejo (RSA). El conjugado de antígeno multivalente debe presentar por lo menos 2 residuos de antígeno por molécula y los residuos del antígeno deben presentar la suficiente distancia de separación para permitir la unión de por lo menos dos anticuerpos al antígeno. Por ejemplo, en un IRMA, el conjugado de antígeno multivalente puede juntarse a una superficie sólida como una esfera plástica.

50 Se agregan antígeno "muestra" no marcado y anticuerpo a antígeno que esté radiactivamente marcado, a un tubo de ensayo que contenga la esfera recubierta de conjugado de antígeno multivalente. El antígeno en la muestra compete con el conjugado de antígeno multivalente para obtener sitios de unión del antígeno anticuerpo. Después de un periodo de incubación apropiado, se eliminan los reactivos no unidos por medio de lavado y se determina la cantidad de radioactividad en la fase sólida. La cantidad de anticuerpo radioactivo unido es inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra.

60 El inmunoensayo enzimático más común es el "ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)". El "ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)" es una técnica para detectar y medir la concentración de un antígeno usando una forma marcada (es decir, enzima ligada) del anticuerpo.

65 En un "ELISA de sándwich", se liga un anticuerpo (es decir, péptido anti- $\Delta 133\text{p}53\beta$ ) a una fase sólida (es decir una placa de microvaloración) y se expone a una muestra biológica que contenga antígeno (es decir, péptido  $\Delta 133\text{p}53\beta$ ). Entonces, se lava la fase sólida para eliminar el antígeno no unido. Entonces, se une una marcada (es decir, una

enzima ligada) al antígeno unido (de estar presente) formando un sándwich de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Los ejemplos de enzimas que pueden ligarse al anticuerpo son: fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, luciferasa, ureasa y 3-galactosidasa. El anticuerpo ligado a enzima reacciona con un sustrato para generar un producto de una reacción de color para el que se puede someter a ensayo.

5 En una "ELISA competitiva", se incuba el anticuerpo con una muestra que contenga antígeno (es decir, un péptido de la isoforma p53). Entonces la mezcla de antígeno-anticuerpo se pone en contacto con una fase sólida recubierta con antígeno (es decir, una placa de microvaloración). A mayor antígeno presente en la muestra, menos anticuerpo libre estará disponible para unirse a la fase sólida. Entonces se agrega un anticuerpo secundario marcado (es decir, enzima ligada) a la fase sólida para determinar la cantidad de anticuerpo primario unido a la fase sólida.

15 En un "ensayo de inmunohistoquímica" se somete a prueba una sección de tejido para proteínas específicas exponiendo el tejido a anticuerpos que sean específicos para la proteína que se esté sometiendo a prueba. Entonces, se visualizan los anticuerpos por medio de una variedad de métodos para determinar la presencia y cantidad de proteína presente. Los ejemplos de los métodos usados para visualizar anticuerpos son, por ejemplo, a través de enzimas ligadas a anticuerpos (es decir, luciferasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano o P-galactosidasa), o métodos químicos (por ejemplo, sustrato/cromógeno DAB) o anticuerpos marcados oro, fluorescentes por cualquiera de muchos diferentes métodos conocidos por los expertos en la materia.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para cribar compuestos antimetastásicos potenciales, que comprenden las etapas de:

- 25 a) poner en contacto el compuesto que se va a someter a prueba con una célula que se sabe que expresa una isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ ,
- b) determinar la presencia de dicha isoforma p53 por un método de detección de dicha isoforma p53 como se describe anteriormente; y
- 30 c) seleccionar dicho compuesto como un compuesto para el cáncer antimetastásico potencial si la isoforma p53 no está expresada en la célula.

35 Opcionalmente, dicho método de cribado puede incluir una etapa adicional d) de someter a prueba el compuesto seleccionado en la etapa c) sobre células, preferentemente células metastásicas, para confirmar las propiedades antimetastásicas del compuesto seleccionado.

40 Por ejemplo, dicha etapa d) también puede corresponder con el método divulgado en la solicitud de patente internacional WO 2006/134305, es decir, un método que comprende la etapa de: poner en contacto células tumorales que no expresan E-cadherina en su membrana celular con el compuesto seleccionado, y determinar la presencia de E-cadherina en la superficie celular, siendo dicha presencia indicativa de actividad antimetastásica.

Dicha etapa d) también puede corresponder al método divulgado en Smith HW, Marra P, Marshall C.J. *J Cell Biol.* 25 Ago 2008; 182(4):777-90, es decir, un método para someter a prueba la invasión de células tumorales en matriz de colágeno tridimensional en la presencia del compuesto seleccionado.

45 Preferentemente, los compuestos que van a ser sometidos a prueba son ARN antisentido o ARN de interferencia (ARNi).

50 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para la producción de anticuerpos policlonales que reconocen específicamente un polipéptido de la isoforma p53 que consiste en polipéptido  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ , en el que dicho método incluye la etapa de:

- 55 a) inmunizar un animal mamífero con una cantidad inmunológicamente efectiva de un polipéptido de la isoforma p53 seleccionado en un grupo que consiste en  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ , o contra un fragmento de epítipo específico de por lo menos una longitud de 9 aminoácidos de dicho polipéptido, opcionalmente con la preparación de mejora del transportador;
- b) opcionalmente, determinar *in vitro* la presencia de anticuerpos específicos en el suero o plasma del animal; y
- 60 c) purificar o aislar el polipéptido específico de anti- $\Delta 133p53$ , anti- $\Delta 133p53\gamma$  y anti- $\Delta 133p53\beta$  a partir del suero o plasma del animal.

65 También forma parte de la presente divulgación, un método para la producción de una célula de hibridoma que puede secretar anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente una isoforma de p53 seleccionada en el grupo que consiste en polipéptidos de  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ , en el que dicho método incluye la etapa de:

- a) inmunizar un animal mamífero con una cantidad inmunológicamente efectiva de una isoforma p53

seleccionada de un grupo que consiste en  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ , o contra un fragmento de epítipo de por lo menos una longitud de 9 aminoácidos de dicho polipéptido, opcionalmente con una preparación de mejora del transportador;

- 5 b) aislar los anticuerpos de linfocitos que producen péptido de la isoforma anti-p53 del bazo, nódulos linfáticos o sangre periférica de ese animal mamífero; y
- c) inmortalizar los anticuerpos de linfocitos que producen polipéptidos anti- $\Delta 133p53$ , anti- $\Delta 133p53\gamma$  y anti- $\Delta 133p53\beta$  por fusión de dichos linfocitos con células de la línea de mieloma de animal mamífero de la misma especie.

También forma parte de la presente divulgación un método para la producción de anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente una isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en polipéptido de  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ , en el que dicho método comprende la etapa de:

- 15 a) producir una célula de hibridoma que puede secretar anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente una isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en polipéptidos  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ , de acuerdo con el método anterior de la invención;
- 20 b) cultivar dicha célula de hibridoma en un medio de cultivo y unas condiciones de cultivo apropiados;
- c) purificar o aislar de dicho medio de cultivo los anticuerpos monoclonales que sean secretados

En otra parte, la presente divulgación incluye anticuerpos policlonales o monoclonales obtenibles por el método de producción de anticuerpos policlonales o monoclonales de acuerdo con la presente invención en donde tales anticuerpos están específicamente reconociendo una isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ .

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un kit para la detección o cuantificación de la isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en ARNm o polipéptido de  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ , en el que tal kit incluye:

- a) un anticuerpo policlonal o monoclonal de acuerdo con la invención; o
- 35 b) un par de cebadores que se seleccionan de entre un grupo que consiste en un par de cebadores que pueden amplificar la secuencia SEC ID nº: 2, SEC ID nº: 4 o SEC ID nº: 6, o un fragmento de la misma que presenta por lo menos una longitud de 10 nucleótidos; o
- 40 c) una sonda que presenta una secuencia de nucleótidos que comprende ya sea un fragmento o por lo menos una longitud de por lo menos 10 nucleótidos de una secuencia de la isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ , o su complemento.

Para los kits basados en anticuerpos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo (es decir, en solución o unido a un soporte sólido) el cual se une a un polipéptido de la isoforma p53 de acuerdo con la invención; y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo diferente conjugado a una marca detectable que se une ya sea al polipéptido de la isoforma p53 o al primer anticuerpo.

Para los kits basados en oligonucleótidos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un oligonucleótido, por ejemplo, un oligonucleótido marcado, que hibrida con la secuencia del ácido nucleico de la isoforma p53 (ARNm o ADNc, o un fragmento específico de ellos) o (2) un par de cebadores útiles para amplificar una molécula de ácido nucleico de la isoforma p53 de la presente invención. El kit también puede incluir, por ejemplo, un agente amortiguador, un conservante o un agente de estabilización de proteína. El kit adicionalmente puede incluir los componentes necesarios para detectar la marca detectable (por ejemplo, una enzima o sustrato). El kit también puede contener una muestra control o una serie de muestras control que puedan someterse a prueba y compararse con la muestra biológica. Cada componente del kit puede incluirse en un contenedor individual y todos los diferentes contenedores pueden estar dentro de un solo paquete, junto con las instrucciones para la interpretación de los resultados de los ensayos realizados usando el kit.

La presente divulgación también se refiere a un método para el complemento del diagnóstico morfológico por medio de la detección o la cuantificación de una isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$  en muestra biológica de mamífero, por medio de los métodos mencionados anteriormente o por un método bien conocido por el experto en la materia, tales como inmunohistoquímico o inmunoensayo para la detección del péptido definido anteriormente o por cualquier método que detecte la secuencia de nucleótido definida anteriormente (por ejemplo, RT-PCR, RT-PCR cuantitativo, FISH, etc.) en cáncer de cualquier tipo (por ejemplo, de mama, colon, páncreas, cabeza y cuello, etc.).

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 representa la supervivencia libre de enfermedad (figura 1a) y las funciones de supervivencia (figura 1b) a lo largo del tiempo en pacientes que expresan  $\Delta 133p53\beta$  o no.

La figura 2 representa la supervivencia libre de enfermedad (figura 2a) y las funciones de supervivencia (figura 2b) a lo largo del tiempo en los pacientes dependiendo de la expresión de  $\Delta 133p53\beta$  y ER.

La figura 3 representa el porcentaje de invasividad (figura 3a) y el porcentaje de migración (figura 3b) dependiendo de la expresión de  $\Delta 133p53\beta$ . La figura 3c es una representación esquemática de la isoforma p53 y  $\Delta 133p53\beta$  (NLS: Señal de Localización Nuclear).

La figura 4a representa el análisis cuantitativo de las células con ampollamiento respecto a las células adherentes en las células positivas GFP.

Las figuras 4b y 4c representan el análisis de transferencia t Western de la expresión de los constructos marcados myc en células usadas por transferencia Western E-cadherina y beta 1-integrina. Adh: células que todavía son adherentes con el soporte; ampolla: células que muestran movimiento de ampollamiento y que se han desprendido del soporte. Se realizó la normalización usando un anticuerpo anti-GAPDH.

Se proporcionan los siguientes ejemplos y las figuras para ilustrar varias formas de realización de la invención y no limitar la presente invención presente de ninguna manera.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1 Material y métodos**

Constructos de ADN, reactivos y anticuerpos

Los constructos de isoformas p53 humanas fueron amablemente proporcionados por J.C. Bourdon. Fueron subclonados en los sitios EcoRI y BamHI de pEGFPC1 (Clonetech) para proporcionar proteínas marcadas GFP o en los sitios BamHI y EcoRI de pLPCmyc para proporcionar proteínas marcadas myc. Se amplificaron las construcciones usando el kit Nucleobond PC 500 (Macherey-Nagel) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se adquirió Y27632 de Calbiochem y se utilizó a 10  $\mu$ M en todos los experimentos.

Se adquirieron los anticuerpos del ratón anti-E-cadherina (clon 36), el ratón anti-beta 1-integrina, el ratón anti-ROCK I y el ratón anti-ROCK II a BD-Transduction Laboratories y fueron diluidos a 1/400°, 1/2500°, 1/250° y 1/250°, respectivamente. Los anticuerpos de ratón anti-RhoA y de conejo anti-ECT2 fueron adquiridos en Santa Cruz (26C4 y C-20, respectivamente) y fueron diluidos a 1/500° y 1/200°, respectivamente. El anticuerpo de ratón anti-GEF-H1 fue amablemente proporcionado por K. Matter y se diluyó a 1/50°. Los anticuerpos de conejo anti-p53 (CM1) fueron amablemente proporcionados por J.C. Bourdon y fueron diluidos a 1/1000°.

Los anticuerpos anti-IgG conjugados de peroxidasa de rábano (HRP) se adquirieron en GE-Healthcare y se diluyeron a 1/5000°.

Se adquirieron los reactivos de quimioluminiscencia Western Lightning (ECL) en PerkinElmer.

Transfecciones y cultivo celular:

Las células Hct116 fueron amablemente proporcionadas por B. Vogelstein y fueron cultivadas a 37°C en presencia de 5% de CO2 en medios en McCoy's 5A (Sigma) suplementados con 10% de suero fetal de becerro (FCS).

Las transfecciones transitorias de las isoformas fueron realizadas usando el kit JetPei (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante: se usaron 9  $\mu$ g de ADN para transfección en un plato de 100 mm de 70% de células confluentes. Después de 24 horas de transfección, se diluyeron las células a la 1/2 y todos los experimentos se realizaron a las 48 horas después de la transfección. Se realizaron las transfecciones transitorias de ARNi a 50 nM usando Interferina (Polyplus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Formación de imágenes en lapso de tiempo:

Se realizó la microscopia Nomarski de lapso de tiempo usando un microscopio Leica invertido DMIRE2 con un obturador automático de kits de filtro GFP, un objetivo de inmersión en aceite 63x (HC x PL APO 1.32-0.6 oil CS), calentador de muestra (37°C) y cámara de incubación de CO2 casera. Las imágenes fueron captadas con software de imágenes con una cámara Micromax CCD (1300Y/HS), convertidas en archivos TIFF y fueron editadas y compiladas con Metamorph. El tiempo de exposición fue de 500 ms para GFP y de 300 ms para luz. Las imágenes

fueron captadas cada 3 seg. y durante 5 minutos o cada 4 minutos durante 12 horas.

FACS

5 Las células transfectadas con las isoformas marcadas GFP de p53 que no se usaron para los ensayos de invasión, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos y fijaron agregando 1mL de 70% de EtOH a -20°C. Se realizó la tinción con yoduro de propidio, y se cuantificó el número de células con expresión GFP comparadas con el total de células en cada condición por medio de FACS usando el *software* CellQuest.

10 Extractos celulares, transferencia Western

Se centrifugó un medio que contenía células con ampollamiento a 1200 rpm durante 5 minutos y se realizó la lisis del sedimento constituido por células invasivas con ampollamiento. Las células adherentes remanentes fueron raspadas suavemente en solución amortiguadora de lisis. Las dos poblaciones de células fueron analizadas por separado para cada una de las condiciones (véase el texto de la figura). La cantidad de proteínas totales en cada extracto fue cuantificada usando el kit BCA (Promega). Se usó gel al 8% SDS-PAGE para detectar E-cadherina, beta 1-integrina, ROCK 1, ROCK 2, ECT2 y GEF-H1, y se usó gel al 12% SDS-PAGE para detectar RhoA. Se cargó una igual cantidad (30 µg) de proteínas en cada carril. Después, se transfirieron las proteínas electroforéticamente sobre nitrocelulosa (para p53, E-cadherina, beta 1-integrina, ROCK 1, ROCK 2, ECT2 y GEF-H1) o membrana PVDF (para GTP-RhoA). Se bloquearon las membranas en TBS/0,1% Tween 20 conteniendo 3% de leche durante una hora y después se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios diluidos en TBS/0,1% Tween 20 conteniendo 3% de leche. Después de varios lavados en TBS/Tween, se incubaron las membranas con anticuerpos Ig anticonejo o antirratorn ligados a HRP. Se desarrollaron las membranas con ECL de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25 Se cuantificaron las autorradiografías escaneadas usando software de densitometría AIDA/2D.

Ensayo de la actividad de RhoA

30 Para el ensayo de actividad de RhoA, se realizó la lisis de las células en 50 mM Tris, pH 7,2, 1% Triton X-100, 0,5% de desoxicolato de sodio, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, y cóctel de inhibidores de proteasa. Se incubaron los lisados aclarados con 25 µg de proteína comercial de fusión GST que contenía el dominio de unión de RhoA de perlas de Rhotekin (GST-RBD, citoesqueleto) durante 30 min a 4°C. Se lavaron cuatro veces los complejos precipitados en solución amortiguadora Tris que contenía 1% de Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM PMSF, que se eluyen con solución amortiguadora de muestra SDS, inmunotransferidos y analizados con anticuerpos específicos para Rho A. Se puso en funcionamiento una alícuota del lisado total usado para precipitación conjuntamente para cuantificar el total de RhoA presente en los lisados celulares. Se cuantificaron las autorradiografías usando el *software* de densitometría Aida/2D y se normalizaron como una función de la expresión de la proteína RhoA.

40 Ensayos de invasión

Se realizó la cuantificación de la invasión celular en cámaras de cultivo celular Transwell que contenían insertos de membrana porosa de policarbonato que bloquean la fluorescencia (Fluoroblock; #351152; BD Biosciences; calibre del poro 8 µm). Fueron preparados 100 µl de 2 mg/ml Matrigel con factores de crecimiento reducidos (un BM reconstituido preparado comercialmente de tumores Englebreth-Holm-Swarm, # 354230; BD Biosciences) en un Transwell. Se realizó la transfección de las células y se trataron o no con Y27632 como monocapas antes de la tripsinización y colocación en placa (10<sup>4</sup>) en medio con 2% de FCS sobre una gruesa capa (de aproximadamente 500 µm) de Matrigel contenido dentro de la cámara superior de un Transwell. Se dejaron los controles sin tratamiento. Entonces se llenaron las cámaras superior e inferior con respectivamente medio con 2% de FCS y medio con 10% de FCS, por lo tanto estableciendo un gradiente soluble de quimioatrayente que permite la invasión celular a través del Matrigel. Se permitió que las células invadieran a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> a través del gel antes de fijar durante 15 min en 3,7% de formaldehído. Se detectaron las células que habían invadido a través del Matrigel en el lado inferior del filtro por fluorescencia GFP y se contaron por número celular. Se contó toda la superficie del filtro se realizó cada ensayo dos veces por triplicado para cada condición.

Pacientes con cáncer de mama

60 C Cáncer de mama primario operable previamente sin tratamiento, de 171 mujeres caucásicas (intervalo de edad: 24-89 años; edad media 64 años) con suficiente excedente de tejido tumoral para requerimientos diagnósticos y se analizaron los datos clínicos y patológicos completos. Un patólogo especialista en cáncer de mama macrodisecó y los tejidos tumorales se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido previo a su almacenamiento a -80°C. Se obtuvo tejido mamario normal de pacientes que se sometieron a mamoplastía de reducción que no tenían historia personal ni familiar de cáncer de mama. Se examinaron las muestras después de la aprobación del Local Research Ethics Committee bajo autoridad delegada por el Tayside Tissue Bank.

Análisis RT-PCR

Se homogenizaron y extrajeron aproximadamente 10 mg de tejido tumoral (>40% de células tumorales) en 750 µl de reactivo de lisis QIAzol (Qiagen Ltd, Crawley, West Sussex, Reino Unido); se confirmó la calidad del ARN usando el  
5 BioAnalyzer 2100™ (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), demostrando 28S/18S ≥1,5 con dos picos pronunciados confirmados antes de RT-PCR.

El ADNc de la isoforma p53 es demasiado larga para ser cuantificada específicamente por medio de RT-qPCR, por tanto se utiliza un método semicuantitativo RT-PCR que requería una relación de alta calidad 28S/18S de ARN total  
10 > 1,5. Después de la transcripción inversa de 500 ng totales de ARN usando cebadores aleatorios, se amplificó la actina del ADNc por medio de PCR para confirmar la eficacia de la transcripción inversa. Se realizó la transcripción inversa de 0,5 µg de ARN total de cada muestra tumoral (AMV RT, 45C, cebador aleatorio) y se confirmó la calidad del ADNc por medio de la amplificación de la actina por medio de PCR en 30 ciclos. Se amplificó el ADNc de la isoforma p53 por medio de 2 PCR anidados de 30 ciclos usando cebadores específicos de cada una de la isoformas  
15 como se describió anteriormente (Bourdon *et al.*, 2005a). Se consideró que los tumores expresaban cada una de las isoformas p53 después de la secuenciación del fragmento de PCR correspondiente.

Análisis de mutación de p53 prueba p53 AmpliChip

La Prueba AmpliChip p53 es un producto que actualmente se encuentra en desarrollo en Roche Molecular Systems, Inc (Pleasanton, California, USA). Se requiere para esta prueba una sección de 10 micras de tejido tumoral embebido en parafina fijado con formalina o 100 ng de ADN genómico purificado de tejido congelado fresco. En este estudio, se usaron 100 ng de ADN genómico extraído de tejidos frescos congelados para la amplificación de  
20 productos que contenían las regiones de codificación del gen p53 en dos reacciones (A y B). La reacción A amplifica los exones 2, 5, 8, 10; el exón 4 corriente arriba secuencia con un control interno, en tanto que la reacción B amplifica para los exones 3, 6, 7, 9, 11; el exón 4 corriente abajo secuencia con el mismo control interno. Se combinaron los productos de PCR generados de las reacciones A y B para ADNasa I clivaje para generar fragmentos pequeños de ADN de un tamaño medio de 50 a 100 nucleótidos. A continuación, se marcaron los amplicones de ADN fragmentado con biotina por transferasa terminal. Se agregaron los fragmentos de ADN diana  
25 de p53 marcados con biotina a la solución amortiguadora de hibridación. Se hibridó la mezcla con los oligonucleótidos ubicados en la micromatriz p 53 AmpliChip usando la Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450Dx y un protocolo específico para p53 de AmpliChip. Se lavó y tiñó la micromatriz hibridada p53 AmpliChip con una tinción fluorescente conjugada con streptavidina (ficoeritrina). Después de la tinción, se escaneó la Micromatriz p53 AmpliChip por medio de un Escáner Affymetrix GeneChip 3000Dx usando un láser que excita la marca fluorescente unida a los fragmentos de ADN diana de p53 hibridada. La cantidad de luz emitida es proporcional al ADN diana  
30 unido a cada locación en la micromatriz de la sonda.

Diseño del chip y análisis de datos de las señales de la micromatriz

La micromatriz p53 AmpliChip diseñada por Roche Molecular System consta de más de 33.000 conjuntos de sonda de más de 220.000 oligonucleótidos individuales dispuestos para un total de 1.268 posiciones de nucleótidos de regiones de codificación de exones 2-11. Un solo conjunto de sonda para una posición de base interrogatoria incluye cinco sondas, una sonda para hibridar al tipo salvaje, tres sondas para detectar tres mutaciones posibles de par de base sencilla y una sonda para detectar la delección sencilla. Por lo menos existen 24 conjuntos de sondas para cada  
40 posición de nucleótidos, incluyendo tanto secuencias de sonda sentido como antisentido. Las micromatrices p53 AmpliChip son fabricadas por Affymetrix utilizando tecnología que combina métodos fotolitográficos y química de combinaciones. El estatus de la mutación p53 se determinó por medio de un algoritmo de detección de mutación p53 desarrollado por Roche Molecular System, que está diseñado para detectar sustituciones de pares de base sencilla y delecciones de par de base sencillas de una muestra en un fondo con intensidades de sonda de ADN de p53 tipo silvestre.  
50

Análisis Estadístico

Se realizó el análisis estadístico usando el *software* estadístico SPSS (referencia necesaria) para Chi cuadrada, prueba exacta de Fisher de 2 colas y análisis de Kaplan-Meier. Se juzgaron los resultados como significativos a niveles de confianza mayores del 95% (P < 0,05).  
55

**Ejemplo 2 Análisis de la expresión de Δ133p53β en pacientes con cáncer de mama**

Cáncer de mama primario operable previamente sin tratamiento, de 171 mujeres caucásicas (intervalo de edad: 24-89 años; edad media 64 años) con suficiente excedente de tejido tumoral para requerimientos diagnósticos y se analizaron los datos clínicos y patológicos completos.  
60

Resultados

En 171 cánceres de mama, se identificó la expresión de Δ133p53 en 50/171 (el 29%), Δ133p53β en 20/171 (el 11%)  
65

y  $\Delta 133p53\gamma$  en 27/171 (el 16%), en tanto que ninguna de las tres isoformas fue detectable en el tejido mamario normal.

5 Se asoció la expresión  $\Delta 133p53\beta$  con metástasis a nódulo linfático de axila (análisis Mann-Whitney, exacto 1-cola,  $p < 0,036$ ) y en relación con lo mismo, los pacientes con tumores que expresaban  $\Delta 133p53\beta$  tuvieron supervivencia libre de enfermedad significativamente peor (log-rango, Cox-Mantel,  $p < 0,025$ ) (figura 1a) y supervivencia general (log-rango, Cox-Mantel,  $p < 0,025$ ) (figura 1b).

10 Se asoció  $\Delta 133p53\beta$  significativamente con una expresión ER baja ( $\chi^2=4,1$ , x d.f.,  $p < 0,043$  respectivamente) particularmente para carcinoma ductal invasivo (142/171 casos), el tipo histológico más común de cáncer de mama, (prueba t pareada,  $p < 0,015$ ).

15 La figura 2a muestra que los pacientes positivos ER que expresan  $\Delta 133p53\beta$  tuvieron una supervivencia libre de enfermedad significativamente peor que los pacientes positivos ER desprovistos de la expresión  $\Delta 133p53\beta$  (log rango, Cox-Mantel,  $p < 0,0002$ , comparación en pares  $\Delta 133p53\beta+$  ER+ vs  $\Delta 133p53\beta-$ ER+,  $p < 0,003$ ). Adicionalmente, la figura 2b muestra que los pacientes positivos ER que expresan  $\Delta 133p53\beta$  tuvieron una supervivencia inesperadamente deficiente en comparación con los pacientes negativos ER (supervivencia: log-rango, Cox-Mantel,  $p < 0,0003$ , comparación en pares  $\Delta 133p53\beta+$ ER+ vs ER-,  $p < 0,658$ ).

20 Por tanto, se asoció  $\Delta 133p53\beta$  con características de pronóstico pobre (metástasis de nódulo en axila, ER negativo), supervivencia libre de enfermedad más corta y peor pronóstico en cáncer de mama primario.

### Ejemplo 3 Papel principal de la isoforma de $\Delta 133p53\beta$ en el proceso invasivo

25 Primero se sometieron a prueba los efectos de la expresión de las isoformas  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$  marcadas GFP sobre la invasión de células de carcinoma de colon y mama que retienen las características epiteliales y expresan wt p53 (hct116 para cáncer colorrectal y MCF7 para cáncer de mama), usando ensayos de invasión (ver métodos).

30 Se usaron las células transfectadas solas GFP como controles negativos. Las células fueron preparadas en placa sobre una gruesa capa de matrigel que reproduce la membrana basal fisiológica. Este ensayo *in vitro* tiene por objetivo imitar el proceso de las células tumorales que atraviesan las membranas basales.

35 La figura 3a muestra que se incrementó significativamente la invasividad por la expresión de la isoforma  $\Delta 133p53\beta$ . Se obtuvieron resultados similares con MCF7 (datos no representados). Esto sugiere que la sobreexpresión de la isoforma  $\Delta 133p53\beta$  ectópica puede superar la actividad migratoria de la p53 endógena.

40 Para determinar qué modo de migración usaron las células que expresan las isoformas p53 para invadir a través del matrigel, se filmaron las isoformas marcadas GFP que expresan células HCT 116. Se observaron dos poblaciones de células: las células epiteliales cohesivas adherentes al vidrio y las células redondeadas que estaban por encima de las cohesivas, en un foco superior. Las células transfectadas con la isoforma  $\Delta 133p53\beta$  marcada GFP generaron estructuras dinámicas tipo ampollas en su superficie. Durante el vídeo, algunas células redondeadas se movieron y entonces algunas células adherentes cohesivas se desprendieron progresivamente del epitelio y devinieron redondeadas (datos no representados). La pérdida de las estructuras adhesivas y la adquisición concomitante del movimiento redondeado con ampollamiento es sorprendentemente similar a la transición ameboide epitelial (EAT). Se realizó un control por FACS de que estos movimientos de ampollamiento no se debieron a apoptosis (datos no representados).

50 Para cuantificar la penetrancia del fenotipo, se separaron las células redondeadas de las células cohesivas y se contaron las células positivas GFP en dos poblaciones por medio de FACS: para  $\Delta 133p53$  y  $\Delta 133p53\gamma$  el número de células con ampollamiento fue de 2,5 y 2,25 veces más elevado que el número de células adherentes respectivamente, en tanto que para  $\Delta 133p53\beta$ , el número de células con ampollamiento fue 4 veces más elevado que el número de células adherentes (figura 4a). Para concluir, este fenotipo es significativamente penetrante, es decir, las células que expresan el isoforma  $\Delta 133p53\beta$  marcada GFP adoptan en gran parte una morfología redondeada y el desprendimiento de células de los epitelios.

60 Durante EAT, inicialmente se disocian las uniones estrechas, después las uniones adherentes desaparecen posteriormente. Dado que E-cadherina es el componente principal de las uniones adherentes, se usa ampliamente como un marcador específico de la integridad de estas uniones. En las células que expresan p53, se expresó E-cadherina a alto nivel en células cohesivas adherentes, en tanto que la expresión de E-cadherina se perdió en las células con ampollamiento (figura 4b), confirmando que las células con ampollamiento han perdido una característica epitelial clave.

65 Las células tumorales que hayan pasado por EAT expresan bajos niveles de beta 1-integrina y así adoptan migración tipo ameboide independiente del proceso de adhesión de integrina. Se evaluó la expresión de la beta 1-integrina en las células hct116 que expresan la isoforma  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\gamma$  y  $\Delta 133p53\beta$ . En el caso de E-

cadherina, las células con ampollamiento no expresaron beta 1-integrina (figura 4c). Se obtuvieron los mismos resultados usando isoformas marcadas myc o GFP. Se controló la expresión de las isoformas marcadas myc por transferencia Western usando un anticuerpo antimyc (datos no representados).

5 Estos resultados muestran que la expresión de las isoformas p 53 con delección del extremo N promueven la transición ameboide epitelial en las células hct116, que consecuentemente migran a través de los movimientos redondeados con ampollamiento. Este modo de migración en más efectivo que la migración mesenquimal indicando que la expresión de estas variantes  $\Delta 133p53\beta$  en los tumores podría estar asociada con un mal pronóstico para los  
10 pacientes. Esto refuerza la idea de que el fallo de la regulación apropiada de la expresión de la isoforma p53 puede tener consecuencias radicales en la progresión tumoral y metástasis.

Dado que el modo de motilidad asociado con el ampollamiento redondeado depende de la señal de ROCK (Rho Kinase), se realizaron los ensayos de invasión en la presencia del inhibidor ROCK, Y27632. El protocolo fue como se describió anteriormente.

15 Los resultados muestran que el tratamiento con Y27632 redujo altamente la invasividad de las células transfectadas indicando que se requiere la actividad de ROCK para la invasividad proporcionada por la expresión de las isoformas de  $\Delta 133p53$ .

20 Recientemente, se ha informado de que dos ROCK homólogos tal vez no sean funcionalmente equivalentes. Para determinar si ambas isoformas ROCK tienen efectos idénticos en los movimientos asociados con ampollamiento redondeado dependiente de las isoformas p53, se estudió la expresión de ROCK I y ROCK II en las células transfectadas. Los resultados muestran que se incrementó la expresión de ROCK I en células adherentes (en comparación con las células control, T), pero se disminuyó significativamente en las células con ampollamiento. En  
25 contraposición, se expresó ROCK II en altos niveles en todas las situaciones, y se mantuvo en particular en las células con ampollamiento. Esto sugiere que se requiere preferentemente ROCK II para el movimiento de ampollamiento en tanto que ROCK I puede estar involucrado en las primeras etapas de la transición epitelial ameboide. A pesar de su alta homología de secuencia (65% de la identidad general y 92% de la identidad en su dominio de cinasa), ROCK I y ROCK II no funcionan en una manera redundante: no hay compensación por la pérdida de ROCK II por parte de ROCK I en los ratones con inactivación génica ("knock out"), y las dos isoformas regulan diferentes aspectos de la actividad de la miosina II. Por lo tanto, se mostraron por primera vez diferentes implicaciones de las dos isoformas ROCK en la migración tipo ameboide y en consecuencia en la invasividad.

35 La reorganización de la actina impulsada por ROCK durante la motilidad con ampollamiento redondeado depende en gran medida de la proteína de la familia de Rho GTPasa: RhoA.

Para investigar el mecanismo por el cual las isoformas p53 ejercen sus efectos sobre la señal de ROCK, se examinó la expresión de RhoA en células adherentes o con ampollamiento que expresan las tres isoformas  $\Delta 133$  de p53.

40 Fueron idénticos los niveles totales de RhoA cuando las células expresaron o no expresaron las isoformas  $\Delta 133$  de p53 (datos no representados). Se mantuvo esta expresión en las células con ampollamiento. Sin embargo, el nivel de expresión de la proteína no refleja la actividad de la cinasa. Se examinó la actividad de RhoA en células adherentes frente a las que presentan ampollamiento que expresan, o no expresan, las isoformas  $\Delta 133p53$  usando ensayos de precipitación de proteína con proteína anzuelo ("pull-down") que capturan sólo la forma unida GTP activa de RhoA. Inicialmente se aprecia una actividad basal de RhoA en células epiteliales adherentes. Sin embargo, se incrementó elevadamente esta actividad en las células con ampollamiento. Resulta de interés que el incremento obtenido con  $\Delta 133\beta$ -p53 fue de 2,5 a 3 veces más alto que los obtenidos con las otras isoformas,  $\Delta 133$ -p53 y  $\Delta 133\gamma$ -p53 que correlacionó con la importante capacidad de las células que expresan  $\Delta 133p$ -53 $\beta$  de perder adhesión superficial.  
45

50 La cuestión surge en relación a si la activación de RhoA en las células que expresan la isoforma  $\Delta 133p$ -53 se debió a una sobreexpresión de los factores activadores del Intercambio de guanina (GEF). El estudio se centró en dos GEF de RhoA que han sido involucrados en mediar la regulación dependiente de p53 de RhoA: GEF-H1, que se ha descubierto que está activado por p53 mutante y cuya expresión está fuertemente correlacionada con el estatus p53 en células cancerosas; y ECT2 que se conoce por ser un objetivo transcripcional de wt p53 y el cual está involucrado en la regulación de las uniones epiteliales.  
55

60 Se descubrió que GEF-H1 estaba sobreexpresado en las células con ampollamiento que expresan las tres isoformas de p53. En contraste, la expresión de ECT2 disminuyó en las células con ampollamiento, en comparación con las células adherentes. Esta regulación a la baja de ECT2 en las células con ampollamiento es compatible con su función conocida como regulador de las uniones epiteliales, pero no explica la activación de RhoA, la cual puede depender de la regulación al alza de GEF-H1. Esto indica los papeles distintos para GEF-H1 y ECT2 durante la transición epitelio-ameboide. Los resultados concuerdan con la habilidad de transformación de GEF-H1 cuando se realiza la transfección en fibroblastos de ratón y la inducción de tumor cuando se inyectan las células transfectadas con GEF-H1 en ratones desnudos. Dos vías opuestas corriente abajo de RhoA están funcionando en la regulación de uniones adherentes: una vía dependiente de ROCK involucrada en la alteración de las uniones epiteliales y una  
65

5 ruta Dia-dependiente que promueve la formación de complejos de cadherina-catenina y estabilización de las uniones. Una posibilidad es que estas dos vías estén activadas por dos GEF diferentes para RhoA: ECT2 podría activar la vía RhoA-Dia para promover la unión adherente ya que este GEF regula la polaridad epitelial y GEF-H1 podría activar la vía RhoA-ROCK para alterar la unión célula-célula y promover la transición ameboide. P53 es el mediador corriente arriba de estas dos vías y la expresión de las isoformas  $\Delta 133$  de p-53 desregula el balance entre las dos vías durante la tumorigénesis.

10 Los datos muestran que la expresión desregulada de las isoformas  $\Delta 133p53$  (isoformas con delección en el dominio del extremo N) confiere una motilidad y una invasividad incrementadas a las células de carcinoma. Esto indica que cambiar la relación de isoformas de p53 favorece la agresividad tumoral incrementada y la capacidad metastásica aumentada para las células cancerosas, y resalta la importancia de los episodios de empalme durante la progresión del cáncer.

15 **Listado de secuencias**

15 <110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

20 <120> Método para someter a prueba a un sujeto que se cree que está predispuesto a presentar un cáncer metastásico

<130> D27629

25 <150> EP 09305633.1  
US 61/221.769

<151> 2009-06-30

<160> 11

30 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 209

<212> PRT

35 <213> homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

40 <223> Proteína delta133p53beta de tumor de Homo sapiens (Genbank NM 001126116.1)

<400> 1

Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp  
1 5 10 15

45 Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys  
20 25 30

Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu  
50 35 40 45

Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His Leu Ile Arg  
50 55 60

55 Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe  
65 70 75 80

Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Val Gly Ser Asp  
85 90 95

60 Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly  
100 105 110

Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser  
115 120 125

65 Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val Arg Val Cys Ala  
130 135 140

# ES 2 601 191 T3

```

Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys
145                               150                               155                               160

5  Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu
                                  165                               170                               175

Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro Leu Asp
    180                               185                               190

10 Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Asp Gln Thr Ser Phe Gln Lys Glu Asn
    195                               200                               205

15 Cys

<210> 2
<211> 2404
<212> ADN
20 <213> homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> proteína delta133p53beta de tumor de Homo sapiens (Genbank NM 001126116.1)
25 <400> 2

tgaggccagg agatggaggc tgcagtgagc tgtgatcaca ccaactgtgct ccagcctgag      60
30 tgacagagca agaccctatc tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaagctcc tgaggtgtag      120
   acgccaactc tctctagctc gctagtgggt tgcaggaggt gcttacgcat gtttgtttct      180
   ttgctgccgt cttccagttg ctttatctgt tcacttgtgc cctgactttc aactctgtct      240
35 ccttcctctt cctacagtac tcccctgccc tcaacaagat gttttgcaa ctggccaaga      300
   cctgccctgt gcagctgtgg gttgattcca ccccccgcc cggcaccgpc gtccgcgcca      360
40 tggccatcta caagcagtca cagcacatga cggaggttgt gaggcgctgc cccaccatg      420
   agcgtgctc agatagcgat ggtctggccc ctctcagca tcttatccga gtggaaggaa      480
   atttgcgtgt ggagtatttg gatgacagaa aacttttctg acatagtgtg gtggtgccct      540
45 atgagccgcc tgaggttggc tctgactgta ccaccatcca ctacaactac atgtgtaaca      600
   gttcctgcat gggcggcatg aaccggaggc ccatcctcac catcatcaca ctggaagact      660
50 ccagtggtaa tctactggga cggaacagct ttgaggtgcg tgtttgtgcc tgtcctggga      720
   gagaccggcg cacagaggaa gagaatctcc gcaagaaagg ggagcctcac cacgagctgc      780
   cccaggggag cactaagcga gcactgccca acaacaccag ctctctctcc cagccaaaga      840
55 agaaaccact ggatggagaa tatttcaccc ttcaggacca gaccagcttt caaaaagaaa      900
   attgttaaag agagcatgaa aatggttcta tgactttgcc tgatacagat gctacttgac      960
60 ttacgatggg gttacttoct gataaactcg tcgtaagttg aaaatattat cctggtggcgt      1020
   gagcgttcg agatgttccg agagctgaat gaggccttg aactcaagga tgcccaggct      1080
   ggggaaggagc caggggggag cagggctcac tccagccacc tgaagtcaa aaagggtcag      1140
65 tctacctccc gccataaaaa actcatgttc aagacagaag ggctgactc agactgacat      1200

```

ES 2 601 191 T3

tctccacttc ttgttcccca ctgacagcct cccaccccca tctctccctc ccttgccatt 1260  
 ttgggttttg ggtctttgaa cccttgcttg caataggtgt gcgtcagaag caccaggac 1320  
 5 ttccatttgc tttgtcccgg ggctccactg aacaagttgg cctgcactgg tgttttgttg 1380  
 tggggaggag gatggggagt aggacatacc agcttagatt ttaaggtttt tactgtgagg 1440  
 gatgtttggg agatgtaaga aatgttcttg cagttaaggg ttagtttaca atcagccaca 1500  
 10 ttctaggtag gggcccactt caccgtacta accagggag ctgtccctca ctgttgaatt 1560  
 ttctctaact tcaaggccca tatctgtgaa atgctggcat ttgcacctac ctcacagagt 1620  
 15 gcattgtgag ggtaaatgaa ataatgtaca tctggccttg aaaccacctt ttattacatg 1680  
 gggctagaa cttgaccccc ttgaggggtgc ttgttccctc tcctgttgg tcggtgggtt 1740  
 ggtagtttct acagttgggc agctggttag gtagagggag ttgtcaagtc tctgctggcc 1800  
 20 cagccaaacc ctgtctgaca acctcttggg gaaccttagt acctaaaagg aaatctcacc 1860  
 ccatcccaca ccctggagga tttcatctct tgtatatgat gatctggatc caccaagact 1920  
 25 tgttttatgc tcagggtcaa tttctttttt cttttttttt ttttttttc tttttctttg 1980  
 agactgggtc tcgctttggt gcccaggctg gaggggagt gcgtgatctt ggcttactgc 2040  
 agcctttgcc tccccggctc gagcagtct gcctcagcct ccggagtagc tgggaccaca 2100  
 30 ggttcatgcc accatggcca gccaaacttt gcatgttttg tagagatggg gtctcacagt 2160  
 gttgcccagg ctggtctcaa actcctgggc tcaggcgatc cacctgtctc agcctccag 2220  
 35 agtgctggga ttacaattgt gagccaccac gtccagctgg aagggtcaac atcttttaca 2280  
 ttctgcaagc acatctgcat tttcacccca cccttcccct ccttctccct ttttatatcc 2340  
 40 catttttata tcgatctctt attttacaat aaaactttgc tgccacctgt gtgtctgagg 2400  
 ggtg 2404

<210> 3  
 <211> 261  
 45 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 50 <223> proteina delta133p53 de tumor de Homo sapiens (Genbank NM 001126115.1)

<400> 3

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

# ES 2 601 191 T3

```

Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Val Gly Ser Asp
      85                      90                      95
5  Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly
      100                      105                      110
Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser
      115                      120                      125
10 Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val Arg Val Cys Ala
      130                      135                      140
Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys
15  145                      150                      155                      160
Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu
      165                      170                      175
20 Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro Leu Asp
      180                      185                      190
Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu Arg Phe Glu Met
25  195                      200                      205
Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala Gln Ala Gly
      210                      215                      220
Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys Ser Lys
30  225                      230                      235                      240
Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu
      245                      250                      255
35 Gly Pro Asp Ser Asp
      260
<210> 4
<211> 2271
40 <212> ADN
    <213> homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
45 <223> proteína delta133p53 de tumor de Homo sapiens (Genbank NM 001126115.1)
<400> 4
50 tgaggccagg agatggaggc tgcagtgagc tgtgatcaca ccactgtgct ccagcctgag      60
   tgacagagca agaccctatc tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaagctcc tgaggtgtag      120
   acgccaactc tctctagctc gctagtgggt tgcaggaggt gcttacgcat gtttgtttct      180
55 ttgctgcogt cttccagttg ctttatctgt tcacttgtgc cctgactttc aactctgtct      240
   ccttcctctt cctacagtac tcccctgccc tcaacaagat gttttgccaa ctggccaaga      300
   cctgcacctg gcagctgtgg gttgattcca caccocgcgc cggcaccgcg gtcccgccca      360
60 tggccatcta caagcagtca cagcacatga cggaggttgt gaggcgctgc ccccaccatg      420
   agcgctgctc agatagcgat ggtctggccc ctctcagca tcttatccga gtggaaggaa      480
65 atttgcgtgt ggagtatttg gatgacagaa aacttttcg acatagtgtg gtggtgcctt      540
   atgagccgcc tgaggttggc tctgactgta ccaccatcca ctacaactac atgtgtaaca      600

```

## ES 2 601 191 T3

```

gttcctgcat gggcgccatg aaccggagggc ccatcctcac catcatcaca ctggaagact 660
ccagtggtaa tctactggga cggaacagct ttgaggtgcg tgtttgtgcc tgtcctggga 720
5 gagaccggcg cacagaggaa gagaatctcc gcaagaaagg ggagcctcac cacgagctgc 780
ccccaggagg cactaagcga gcaactgccc acaacaccag ctctctctccc cagccaaaga 840
10 agaaaccact ggatggagaa tatttcaccc ttcagatccg tgggcgtgag cgcttcgaga 900
tgttccgaga gctgaatgag gccttggaac tcaaggatgc ccaggctggg aaggagccag 960
gggggagcag ggctcactcc agccacctga agtccaaaaa gggtcagtct acctcccgcc 1020
15 ataaaaaact catgttcaag acagaagggc ctgactcaga ctgacattct ccacttcttg 1080
ttccccactg acagcctccc acccccatct ctccctcccc tgccattttg ggttttgggt 1140
20 ctttgaacct ttgcttgcaa taggtgtgcg tcagaagcac ccaggacttc catttgcttt 1200
gtccccggggc tccactgaac aagttggcct gcaactgggt tttgttggg ggaggaggat 1260
ggggagtagg acataccagc ttagatttta aggtttttac tgtgagggat gtttgggaga 1320
25 tgtaagaaat gttcttgca gtaagggta gtttacaatc agccacattc taggtagggg 1380
cccacttcac cgtactaacc agggaagctg tcctcactg ttgaattttc tctaacttca 1440
30 aggcccatat ctgtgaaatg ctggcatttg cacctacctc acagagtgca ttgtgagggg 1500
taatgaaata atgtacatct ggccttgaaa ccacctttta ttacatgggg tctagaactt 1560
gaccccttg aggggtgcttg ttccctctcc ctgttggtcg gtgggttggg agtttctaca 1620
35 gttgggcagc tggtaggta gagggagttg tcaagtctct gctggcccag ccaaaccctg 1680
tctgacaacc tcttggtgaa ccttagtacc taaaaggaaa tctcacccca tcccacacc 1740
40 tggaggattt catctcttgt atatgatgat ctggatccac caagacttgt tttatgctca 1800
gggtcaattt cttttttctt tttttttttt ttttttcttt ttctttgaga ctgggtctcg 1860
ctttgttgcc caggctggag tggagtggcg tgatcttggc ttactgcagc ctttgctcc 1920
45 ccggctcgag cagtcctgcc tcagcctccg gtagctggg gaccacaggt tcatgccacc 1980
atggccagcc aacttttgca tgttttgtag agatgggggtc tcacagtgtt gccagggctg 2040
50 gtctcaaaact cctgggctca ggcgatccac ctgtctcagc ctcccagagt gctgggatta 2100
caattgtgag ccaccacgtc cagctggaag ggtcaacatc ttttacattc tgcaagcaca 2160
tctgcatttt caccccacc ttcccctct tctccctttt tatatccat ttttatatcg 2220
55 atctcttatt ttacaataaa actttgctgc cacctgtgtg tctgaggggt g 2271

<210> 5
<211> 214
60 <212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
65 <223> proteína delta133p53gamma de tumor de Homo sapiens (Genbank NM 001126117.1)

<400> 5

```

# ES 2 601 191 T3

	Met	Phe	Cys	Gln	Leu	Ala	Lys	Thr	Cys	Pro	Val	Gln	Leu	Trp	Val	Asp
	1				5					10					15	
5	Ser	Thr	Pro	Pro	Pro	Gly	Thr	Arg	Val	Arg	Ala	Met	Ala	Ile	Tyr	Lys
			20						25					30		
	Gln	Ser	Gln	His	Met	Thr	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Cys	Pro	His	His	Glu
			35					40					45			
10	Arg	Cys	Ser	Asp	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Ile	Arg
		50					55					60				
	Val	Glu	Gly	Asn	Leu	Arg	Val	Glu	Tyr	Leu	Asp	Asp	Arg	Asn	Thr	Phe
15	65					70					75					80
	Arg	His	Ser	Val	Val	Val	Pro	Tyr	Glu	Pro	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Asp
				85						90					95	
20	Cys	Thr	Thr	Ile	His	Tyr	Asn	Tyr	Met	Cys	Asn	Ser	Ser	Cys	Met	Gly
				100					105					110		
	Gly	Met	Asn	Arg	Arg	Pro	Ile	Leu	Thr	Ile	Ile	Thr	Leu	Glu	Asp	Ser
25			115					120					125			
	Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Cys	Ala
		130					135					140				
	Cys	Pro	Gly	Arg	Asp	Arg	Arg	Thr	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Arg	Lys	Lys
30	145					150					155					160
	Gly	Glu	Pro	His	His	Glu	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Thr	Lys	Arg	Ala	Leu
				165						170					175	
35	Pro	Asn	Asn	Thr	Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Pro	Lys	Lys	Lys	Pro	Leu	Asp
				180					185					190		
	Gly	Glu	Tyr	Phe	Thr	Leu	Gln	Met	Leu	Leu	Asp	Leu	Arg	Trp	Cys	Tyr
40			195					200					205			
	Phe	Leu	Ile	Asn	Ser	Ser										
		210														
45	<210> 6															
	<211> 2331															
	<212> ADN															
	<213> homo sapiens															
50	<220>															
	<221> misc_feature															
	<223> proteína p53 de tumor de Homo sapiens, delta133p53gamma (Genbank NM 001126117.1)															
	<400> 6															
55	tgaggccagg	agatggaggc	tgca	gtgagc	tgatgac	ccactgtgct	ccagcctgag									60
	tgacagagca	agaccctatc	tcaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	gaaaagctcc	tgaggtgtag										120
	acgccaactc	tctctagctc	gctagtgggg	tgca	gagaggt	gcttacgcat	gtttgtttct									180
60	ttgctgccgt	cttccagttg	ctttatctgt	tcactgtg	cctgactttc	aactctgtct										240
	ccttcctctt	cctacagtac	tcccctgccc	tcaacaagat	gttttgccaa	ctggccaaga										300
65	cctgcccctgt	gcagctgtgg	gttgattcca	cacccccgcc	cggcaccgcg	gtccgcgcca										360
	tggccatcta	caagcagtca	cagcacatga	cggaggttgt	gaggcgctgc	ccccaccatg										420

# ES 2 601 191 T3

	agcgtgctc agatagcgat ggtctggccc ctctcagca tcttatccga gtggaaggaa	480
5	atltgcgtgt ggagtatttg gatgacagaa acacttttcg acatagtgtg gtggtgcctt	540
	atgagccgcc tgaggttggc tctgactgta ccaccatcca ctacaactac atgtgtaaca	600
	gttctgcat gggcggcatg aaccggaggc ccacctcac catcatcaca ctggaagact	660
10	ccagtggtaa tctactggga cggaacagct ttgaggtgcy tgtttgtgcc tgtcctggga	720
	gagaccggcg cacagaggaa gagaatctcc gcaagaaagg ggagcctcac cacgagctgc	780
15	cccagggag cactaagcga gactgcccc acaacaccag ctctctccc cagccaaaga	840
	agaaaccact ggatggagaa tatttcaccc ttcagatgct acttgactta cgatggtgtt	900
	acttctgat aaactcgtcg taagttgaaa atattatccg tgggcgtgag cgcttcgaga	960
20	tgttccgaga gctgaatgag gccttggaac tcaaggatgc ccaggctggg aaggagccag	1020
	gggggagcag ggctcactcc agccactga agtccaaaaa gggtcagtct acctcccgcc	1080
25	ataaaaaact catgttcaag acagaagggc ctgactcaga ctgacattct ccacttcttg	1140
	ttccccactg acagcctccc acccccactct ctccctccc tgccattttg ggttttgggt	1200
	ctttgaacc ttgctgcaa taggtgtgcy tcagaagcac ccaggacttc catttgcttt	1260
30	gtcccggggc tccactgaac aagttggcct gactggtgt tttgtgtgg ggaggaggat	1320
	ggggagtagg acataccagc ttagatttta aggtttttac tgtgagggat gtttgggaga	1380
35	tgtaagaaat gttcttgca ttaagggta gttacaatc agccacattc taggtagggg	1440
	cccactcac cgtactaacc agggaagctg tccctcactg ttgaattttc tctaacttca	1500
	aggccatat ctgtgaaatg ctggcatttg cacctacct acagagtgca ttgtgagggg	1560
40	taatgaaata atgtacatct ggccttgaaa ccacctttta ttacatgggg tctagaactt	1620
	gaccccttg aggtgcttg ttccctctcc ctgttggtcg gtgggttggg agtttctaca	1680
45	gttgggcagc tggtaggta gagggagttg tcaagtctct gctggcccag ccaaaccctg	1740
	tctgacaacc tcttggtgaa ccttagtacc taaaaggaaa tctcaccoca tcccacacc	1800
	tggaggattt catctcttgt atatgatgat ctggatccac caagacttgt tttatgctca	1860
50	gggtcaattt cttttttctt tttttttttt tttttcttt ttctttgaga ctgggtctcg	1920
	ctttgttgc caggctggag tggagtggcg tgatcttggc ttactgcagc ctttgctcc	1980
55	ccggtctgag cagtctgcc tcagcctccg gagtagctgg gaccacaggt tcatgccacc	2040
	atggccagcc aacttttgca tgtttttag agatggggtc tcacagtgtt gccagggctg	2100
	gtctcaaaact cctgggctca ggcgatccac ctgtctcagc ctcccagagt gctgggatta	2160
60	caattgtgag ccaccacgct cagctggaag ggtcaacatc ttttacattc tgcaagcaca	2220
	tctgcatttt caccacacc ttcccctct tctccctttt tatatccat ttttatatcg	2280
65	atctcttatt ttacaataaa actttgctgc cacctgtgtg tctgaggggt g	2331
	<210> 7	
	<211> 393	

# ES 2 601 191 T3

<212> PRT  
 <213> homo sapiens

<220>

5 <221> misc\_feature

<223> proteína p53 de tumor de Homo sapiens (Genbank NM 000546.4)

<400> 7

```

10 Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
    1                    5                      10                15

    Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
    20                25                      30

15 Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
    35                40                      45

    Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
    50                55                      60

20 Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
    65                70                      75                80

25 Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
    85                90                      95

    Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
    100               105                      110

30 Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
    115               120                      125

    Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
    130               135                      140

35 Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
    145               150                      155                160

40 Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
    165               170                      175

    Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
    180               185                      190

45 His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
    195               200                      205

    Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
    210               215                      220

50 Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
    225               230                      235                240

55 Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
    245               250                      255

    Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
    260               265                      270

60 Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
    275               280                      285

    Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
    290               295                      300

65 Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
  
```

# ES 2 601 191 T3

	305	310	315	320
	Lys Pro Leu Asp	Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu		
5		325	330	335
	Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp			
		340	345	350
10	Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His			
		355	360	365
	Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met			
		370	375	380
15	Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp			
	385	390		
	<210> 8			
	<211> 2586			
20	<212> ADN			
	<213> homo sapiens			
	<220>			
	<221> misc_feature			
25	<223> proteína p53 de tumor de Homo sapiens (Genbank NM 000546.4)			
	<400> 8			
30	gattgggggtt ttcccctccc atgtgctcaa gactggcgct aaaagttttg agcttctcaa			60
	aagtctagag ccaccgtcca gggagcaggt agctgctggg ctccggggac actttgcggt			120
	cgggctggga gcgtgctttc cacgacggtg acacgcttcc ctggattggc agccagactg			180
35	ccttccgggt cactgccatg gaggagccgc agtcagatcc tagcgtcgag ccccctctga			240
	gtcaggaaac attttcagac ctatggaaac tacttctctga aaacaacggt ctgtccccct			300
40	tgccgtcca agcaatgat gatttgatgc tgtccccgga cgatattgaa caatggttca			360
	ctgaagacc aggtccagat gaagctcca gaatgccaga ggctgctccc cccgtggccc			420
	ctgcaccagc agctcctaca ccggcggccc ctgcaccagc ccctcctgg ccctgtcat			480
45	cttctgtccc tccccagaaa acctaccagg gcagctacgg tttccgtctg ggcttcttgc			540
	attctgggac agccaagtct gtgacttgca cgtactcccc tgccctcaac aagatgtttt			600
50	gccaactggc caagacctgc cctgtgcagc tgtgggttga ttccacacc ccgcccggca			660
	cccgcgtccg cgccatggcc atctacaagc agtcacagca catgacggag gttgtgaggc			720
	gctgccccca ccatgagcgc tgctcagata gcatgggtct ggcccctcct cagcatctta			780
55	tccgagtgga aggaaatttg cgtgtggagt atttggatga cagaaact tttcgacata			840
	gtgtgggtgt gccctatgag ccgctgagg ttggctctga ctgtaccacc atccactaca			900
60	actacatgtg taacagttcc tgcatgggcg gcatgaaccg gaggccatc ctcaccatca			960
	tcacactgga agactccagt ggtaatctac tgggacggaa cagctttgag gtgcgtgttt			1020
	gtgcctgtcc tgggagagac ccggcacag aggaagagaa tctccgcaag aaaggggagc			1080
65	ctcaccacga gctgccccca gggagcacta agcagcact gcccaacaac accagctcct			1140
	ctccccagcc aaagaagaaa cactggatg gagaatattt cacccttcag atccgtgggc			1200

# ES 2 601 191 T3

	gtgagcgctt cgagatgttc cgagagctga atgaggcctt ggaactcaag gatgcccagg	1260
5	ctgggaagga gccagggggg agcagggctc actccagcca cctgaagtcc aaaaagggtc	1320
	agtctacctc ccgccataaa aaactcatgt tcaagacaga agggcctgac tcagactgac	1380
	attctccact tcttgttccc cactgacagc ctcccacccc catctctccc tcccctgcca	1440
10	ttttggggtt tgggtctttg aacccttgct tgcaataggt gtgcgtcaga agcaccagg	1500
	acttccattt gctttgtccc ggggctccac tgaacaagtt ggctgcact ggtgttttgt	1560
15	tgtggggagg aggatgggga gtaggacata ccagcttaga ttttaagggt tttactgtga	1620
	gggatgtttg ggagatgtaa gaaatgttct tgcagttaag ggtagttta caatcagcca	1680
	cattctaggt aggggcccac ttcaccgtac taaccagga agctgtccct cactgttgaa	1740
20	ttttctctaa cttcaaggcc catatctgtg aaatgctggc atttgcacct acctcacaga	1800
	gtgcattgtg aggggttaat aaataatgta catctggcct tgaaccacc ttttattaca	1860
25	tgggtcttag aacttgacct ccttgagggt gcttgttccc tctccctggt ggtcgggtgg	1920
	ttggtagttt ctacagttgg gcagctggtt aggtagaggg agttgtcaag tctctgctgg	1980
	cccagccaaa cctgtctga caacctcttg gtgaacctta gtacctaaaa ggaaatctca	2040
30	ccccatcca caccctggag gatttcatct cttgtatatg atgatctgga tccaccaaga	2100
	cttgttttat gctcagggtc aatttctttt ttcttttttt tttttttttt tctttttctt	2160
35	tgagactggg tctcgctttg ttgccaggc tggagtggag tggcgtgatc ttggcttact	2220
	gcagcctttg cctccccggc tcgagcagtc ctgcctcagc ctccggagta gctgggacca	2280
	caggttcatg ccaccatggc cagccaactt ttgcatgttt tgtagagatg gggctcaca	2340
40	gtgttgccca ggctggtctc aaactcctgg gctcaggcga tccacctgtc tcagcctccc	2400
	agagtgtgg gattacaatt gtgagccacc acgtccagct ggaaggtca acatctttta	2460
45	cattctgcaa gcacatctgc atttcacc caccctccc ctcttctcc ctttttatat	2520
	cccattttta tatcgatctc ttattttaca ataaaacttt gctgccacct gtgtgtctga	2580
	gggggtg	2586
50	<210> 9 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador directo DNP53-228F para la detección de delta133p53, delta133p53beta y delta133p53gamma	
60	<400> 9 actctgtctc cttctcttcc ctacag	26
65	<210> 10 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	

# ES 2 601 191 T3

<220>

<223> Cebador inverso JWR para la detección de delta133p53, delta133p53beta y delta133p53gamma

5 <400> 10

gtgtggaatc aaccacagc t

21

<210> 11

10 <211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> sonda p53 para la detección de delta133p53, delta133p53beta y delta133p53gamma

<400> 11

tcccctgccc tcaacaagat gttttgcc

28

20

**REIVINDICACIONES**

1. Método de someter a prueba a un sujeto que se cree que presenta una predisposición a presentar un cáncer metastásico que comprende la etapa de:

- i) analizar una muestra biológica seleccionada de entre el grupo que consiste en médula ósea, suero, plasma, sangre, linfa o células de tejido canceroso o presuntamente canceroso o tejido adyacente del mismo de dicho sujeto para detectar la presencia de una isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en  $\Delta 133p53\beta$ ,  $\Delta 133p53$  y  $\Delta 133p53\gamma$ ,

siendo la presencia de dicha isoforma p53 indicativa de una predisposición a un cáncer metastásico.

2. Método para determinar la respuesta de un sujeto a una terapia contra un cáncer metastásico, recibiendo o habiendo recibido dicho sujeto una terapia para un estado asociado con un cáncer metastásico, que comprende la etapa de:

- i) determinar si la isoforma p53 seleccionada en el grupo que consiste en  $\Delta 133p53\beta$ ,  $\Delta 133p53$  y  $\Delta 133p53\gamma$  se encuentra presente o no en una muestra biológica seleccionada de entre el grupo que consiste en médula ósea, suero, plasma, sangre, linfa o células de tejido canceroso o presuntamente canceroso o tejido adyacente del mismo, del sujeto.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la presencia de una isoforma p53 seleccionada de entre el grupo que consiste en  $\Delta 133p53\beta$ ,  $\Delta 133p53$  y  $\Delta 133p53\gamma$  se evalúa detectando un polipéptido de la isoforma p53 o un fragmento del mismo, o detectando un ARNm de la isoforma p53 o un fragmento del mismo.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una etapa adicional de amplificar dicho ARNm o ADNc de la isoforma p53, la secuencia complementaria del mismo, o un fragmento del mismo que presenta una longitud de por lo menos 10 nucleótidos que es específico de dicha isoforma p53.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se realiza la determinación de la presencia de una isoforma p53 seleccionada de entre el grupo que consiste en  $\Delta 133p53\beta$ ,  $\Delta 133p53$  y  $\Delta 133p53\gamma$  mediante una sonda capaz de hibridar específicamente con dicho ARNm de la isoforma p53, secuencia complementaria del mismo o un fragmento del mismo que presenta una longitud de por lo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos que es específico de dicha isoforma p53, que hibrida preferentemente con el ARNm de  $\Delta 133p53\beta$  que presenta la secuencia SEC ID n°: 2.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la determinación de la presencia del ARNm de una isoforma p53 seleccionada de entre el grupo que consiste en  $\Delta 133p53\beta$ ,  $\Delta 133p53$  y  $\Delta 133p53\gamma$ , es realizada mediante el método siguiente que comprende las etapas de:

- a. poner en contacto una sonda de ácido nucleico específica de dicha isoforma p53 bajo unas condiciones de hibridación con la muestra de prueba biológica que comprende:

- unas moléculas de ARN aisladas de una muestra biológica del sujeto humano, en el que se sospecha que la muestra biológica contiene células tumorales, o
- unas moléculas de ácido nucleico sintetizadas a partir de las moléculas de ARN aisladas como ADNc,

en el que la sonda de ácido nucleico presenta un secuencia de nucleótidos que comprende un fragmento de una longitud de por lo menos 15 nucleótidos de la secuencia de la isoforma p53, o un fragmento de la misma, o su complemento, y

- b. detectar la formación de híbridos de la sonda de ácido nucleico y la muestra de prueba;

en el que la presencia de híbridos indica la presencia de células metastásicas en el tejido obtenido del sujeto humano.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la determinación de la presencia de una isoforma p53 seleccionada de entre el grupo que consiste en  $\Delta 133p53\beta$ ,  $\Delta 133p53$  y  $\Delta 133p53\gamma$  se realiza poniendo en contacto la muestra biológica con un anticuerpo específico del polipéptido de la isoforma p53 o un fragmento del mismo y determinando la unión del anticuerpo a la muestra biológica.

8. Método de cribado de compuestos antimetastásicos potenciales, que comprenden las etapas de:

- a) poner en contacto el compuesto que va a ser sometido a prueba con una célula conocida por presentar una

isoforma p53 seleccionada de entre el grupo que consiste en  $\Delta 133p53\beta$ ,  $\Delta 133p53$  y  $\Delta 133p53\gamma$ ;

b) determinar la presencia de dicha isoforma p53 mediante un método de detección de dicha isoforma p53 según las reivindicaciones 1 a 7; y

5 c) seleccionar dicho compuesto como un compuesto antimetastásico potencial si la isoforma p53 no está presente en la célula.

10 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cáncer es un cáncer de mama o un cáncer de colon.

Figura 1a:  $\Delta 133p53\beta$  está asociada con un riesgo elevado de recidiva

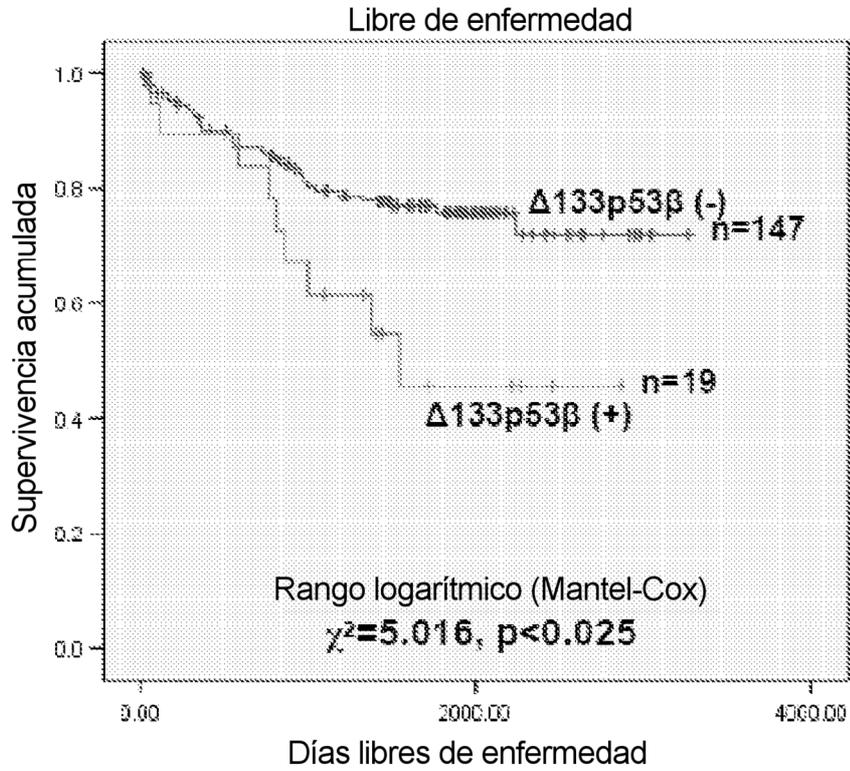
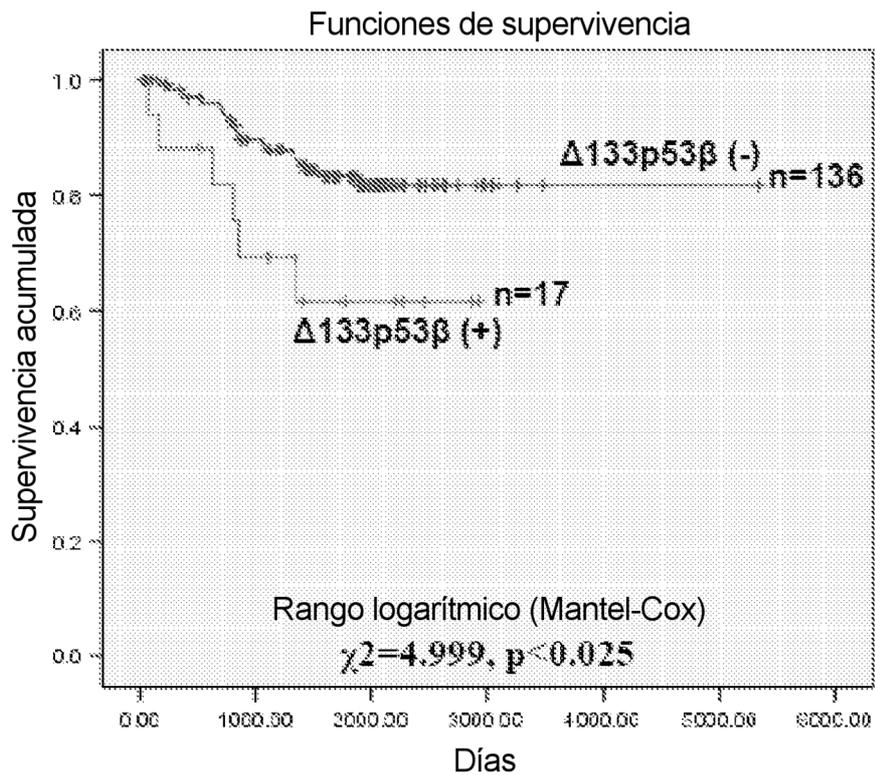
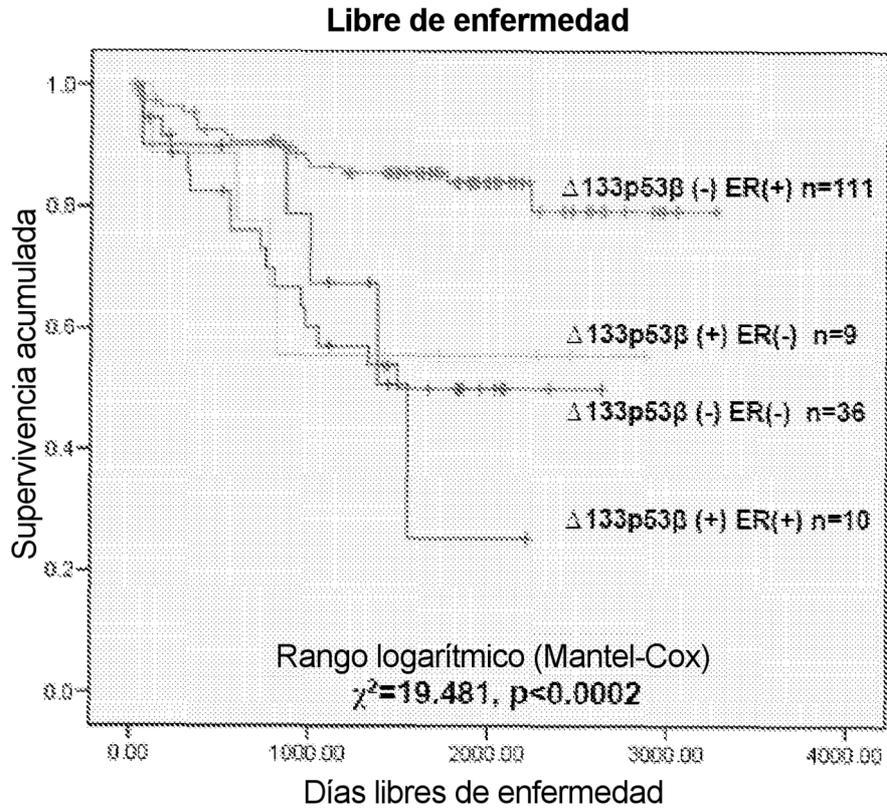


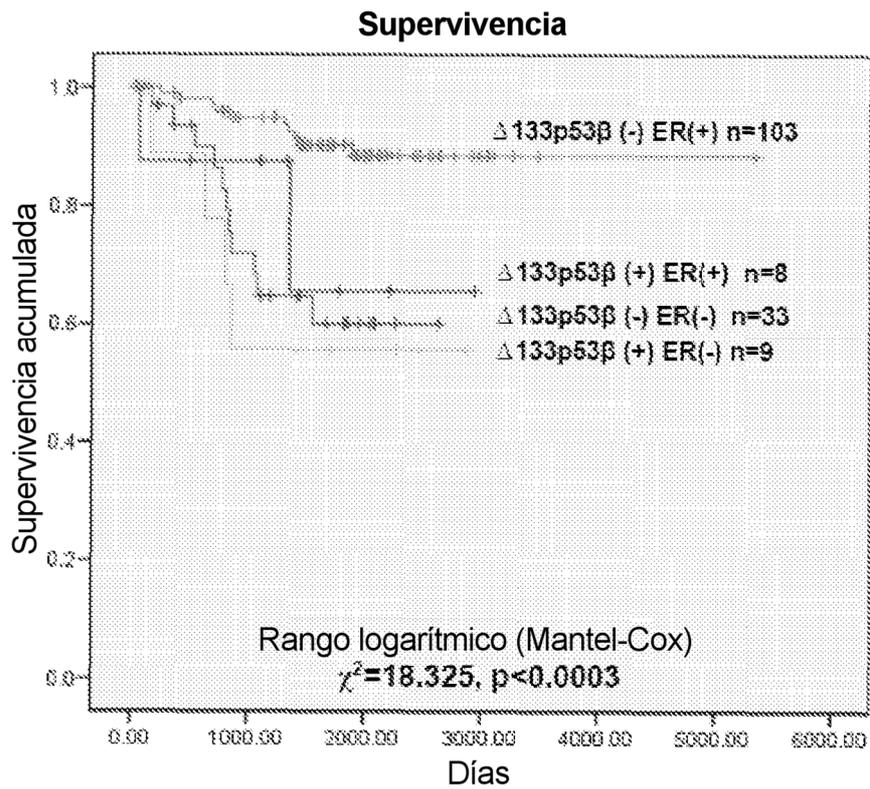
Figura 1b:  $\Delta 133p53\beta$  está asociada con una supervivencia escasa



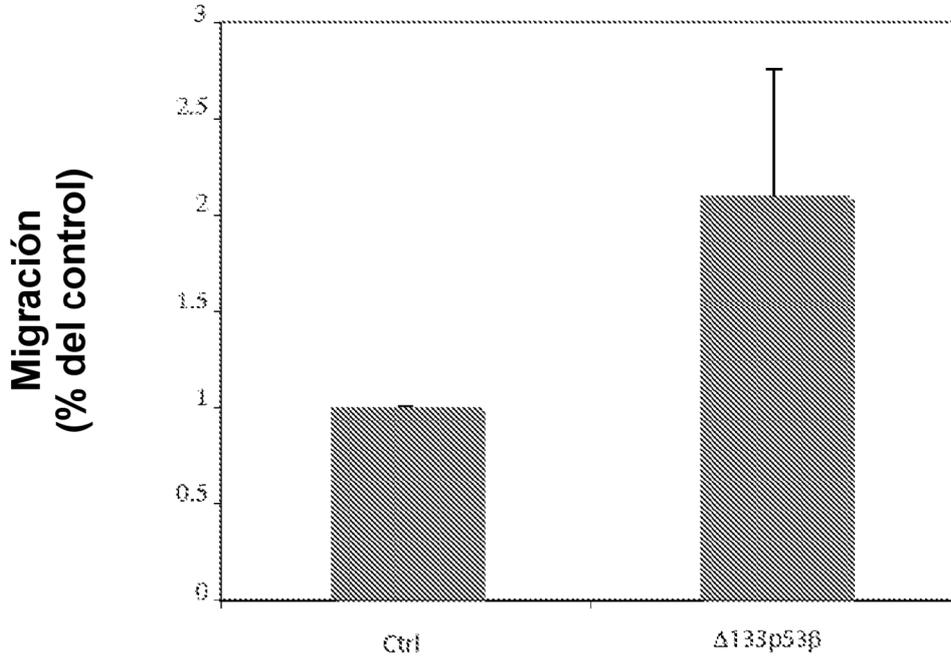
**FIG. 2a**



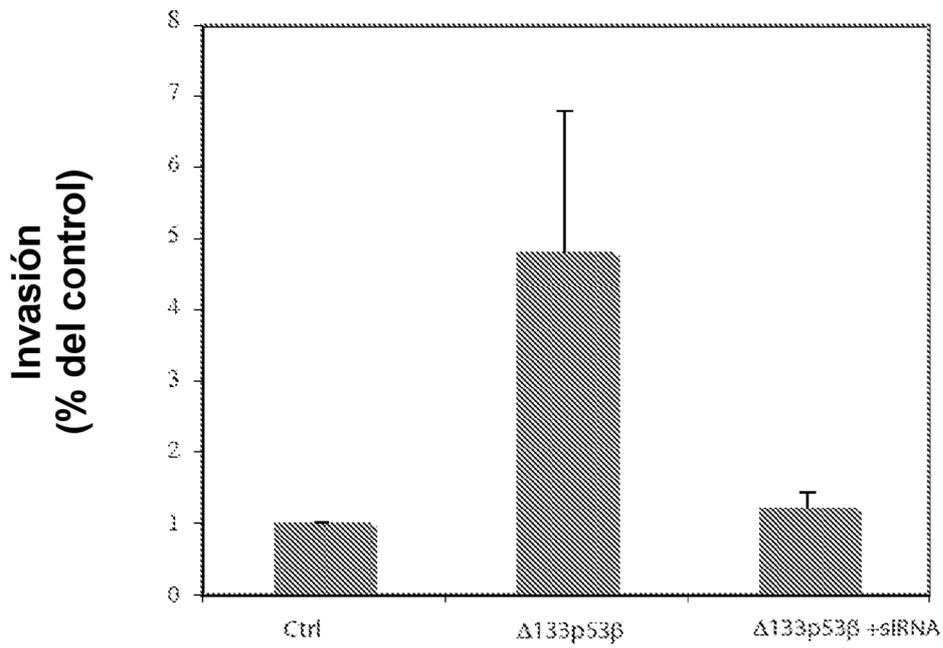
**FIG. 2b**



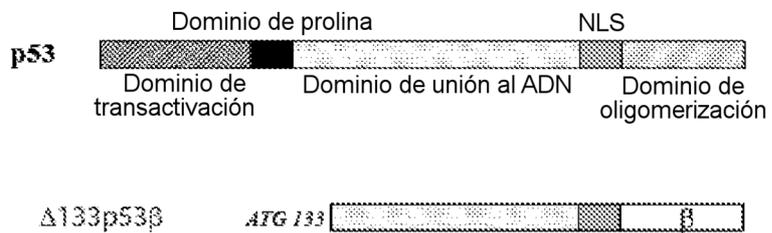
**Fig. 3a**



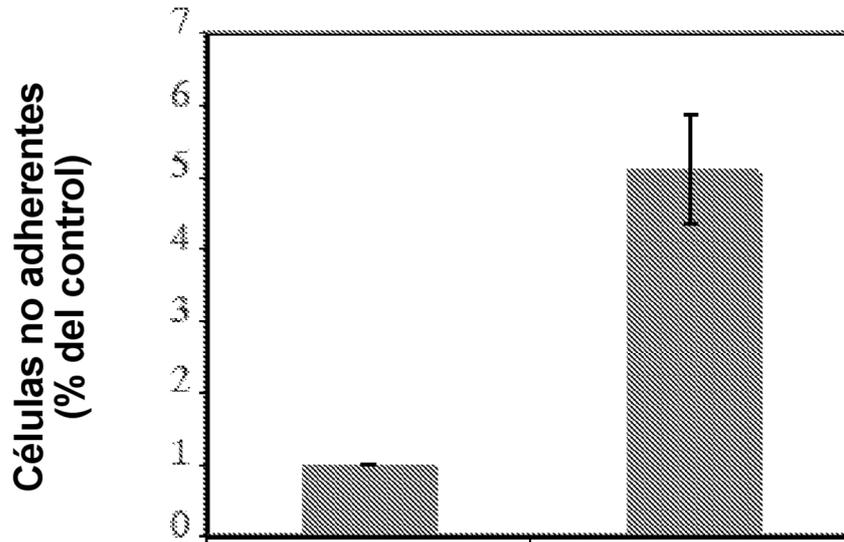
**Fig. 3b**



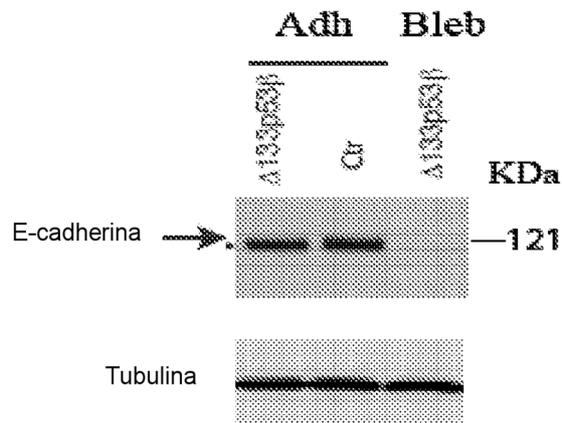
**Fig. 3c**



**Fig. 4a**



**Fig. 4b**



**Fig. 4c**

