

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 631**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2015 PCT/US2015/010653**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15105996**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2015 E 15734826 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3092492**

54 Título: **Tratamiento de tumores que expresan p53 mutante**

30 Prioridad:

09.01.2014 US 201461925278 P

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

13.07.2020

73 Titular/es:

**SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER
RESEARCH (100.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:

**MANCHADO, EUSEBIO;
WEISSMUELLER, SUSANN;
LOWE, SCOTT, W. y
SABOROWSKI, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 773 631 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

Tratamiento de tumores que expresan p53 mutante

5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos con número de serie 61/925.278, presentada el 9 de enero de 2014.

10 Antecedentes

El gen p53, llamado gen supresor de tumores, está presente en todas las células. La expresión de la proteína p53 se induce después de diferentes formas de estrés celular, lo que conduce a varios resultados antiproliferativos. Normalmente, p53 actúa para inducir la expresión de varios genes antiproliferativos mediante la activación de la transcripción. La mutación en el gen p53 es la mutación más común en el cáncer; está presente en aproximadamente la mitad de todos los tumores cancerosos, el 80% en todos los tumores de cáncer de colon, el 50% de los tumores de cáncer de pulmón y el 40% de los tumores de cáncer de mama. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar y desarrollar agentes contra los efectos del p53 mutante para la terapéutica del cáncer.

20 Xiangbing Meng et al., (2013) *Obstetrics and Gynecology International*. 2013: 1-10 informa los efectos de BIBF1120 en las células de cáncer de endometrio. Abouantoun et al. (2009) *Molecular Cancer Therapeutics*. 8: 1137-1147 demuestra el efecto de imatinib en las células cancerosas D556. Sanna-Maria Hede et al. (2009) *Glia*. 57: 1143-1153 demuestra la formación de tumores cerebrales en ratones que sobreexpresan PDGFb. Podtcheko A et al. (2003) *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88: 1889-1896 demuestran la actividad de un inhibidor de tirosina quinasa, STI571, en células de cáncer de tiroides. Carl-Henrik Heldin (2013) *Cell Communication and Signaling*. 11:97 revisa el papel de la señalización de PDGF en el desarrollo tumoral.

Sumario

30 La presente descripción abarca el descubrimiento de que la sobrerregulación inducida por p53 mutante del receptor b del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRb) contribuye a la invasión y/o metástasis de tumores que expresan p53 mutante. Específicamente, la presente divulgación abarca el descubrimiento de que el p53 mutante puede alterar un complejo p73/NF-Y (que puede reprimir la transcripción de PDGFRb), lo que conduce a la transcripción de PDGFRb. Por lo tanto, la presente descripción proporciona, al menos en parte, moduladores de PDGFRb (por ejemplo, activadores o inhibidores) para su uso en medicina, y específicamente en el diagnóstico, tratamiento y/o prevención (por ejemplo, retraso del inicio) de ciertos trastornos, por ejemplo, cáncer.

40 En un aspecto, la invención está dirigida a un agente terapéutico contra un receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRβ) para su uso en el tratamiento o prevención de metástasis tumoral, en un sujeto que tiene una ganancia de función de la mutación p53 que aumenta sus propiedades oncogénicas en relación con el tipo silvestre, en el que el tumor es un tumor de cáncer de páncreas, un tumor de cáncer colorrectal o un tumor de cáncer de ovario.

45 Breve descripción de los dibujos

Las siguientes figuras se presentan solo con fines ilustrativos, y no pretenden ser limitantes.

50 La Figura 1A (panel izquierdo) es un gráfico de cuantificaciones de distancias de heridas en ensayos de heridas por rasguño de 0, 3, 7 y 10 horas después de la herida de células policlonales de KPC que expresan establemente un ARNph de control no dirigido (sh.Ctrl) o un ARNph dirigido a p53 mutante (sh.p53) o células policlonales KP₁C que expresan establemente un sh.Ctrl. Se muestra el ancho de espacio promedio de tres ubicaciones independientes ± DE. *** indica p 0.001 de acuerdo con lo determinado por una prueba t de Student. La Figura 1A (panel derecho) son imágenes de contraste de fase representativas de grabaciones de células vivas de cada afección a las 0 y 10 horas.

55 La Figura 1B (panel izquierdo) es un gráfico de invasión de KPC+sh.p53 y +sh.Ctrl, así como las células KP₁C que expresan el control de GFP y el vector p53 mutante (175H y 273H). Se permitió que las células invadieran el colágeno durante 72 h antes de la cuantificación. Se muestra el promedio de células invadidas de 9 réplicas ± DE. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos repetidos. ** y **** indican p 0.005 y p 0.0001, respectivamente. La Figura 1B (panel derecho) son reconstrucciones tridimensionales representativas de cada afección descrita en la Figura 1A. Las células se tiñeron con F-actina (rojo) y DAPI (azul); la línea discontinua indica la posición aproximada de la membrana Transwell; la flecha indica la dirección del movimiento.

65 La Figura 1C (panel izquierdo) es un gráfico del número de metástasis después de la inyección ortotópica de células KPC+sh.p53 o +sh.Ctrl en el páncreas de ratones atímicos. Cuando los ratones experimentaron síntomas, fueron sacrificados y se cuantificó la diseminación metastásica en pulmón e hígado contando nódulos macroscópicos

positivos para GFP. Los datos se representan como la media \pm DE. La Figura 1C (panel derecho) son imágenes representativas fusionadas de campo claro/GFP de pulmón e hígado.

5 La Figura 2A es un flujo de trabajo esquemático de secuenciación de ARN. 1, 2 y 3 representan líneas celulares clonales individuales de KPC+sh.p53 y +sh.Ctrl.

La Figura 2B es un gráfico ($p < 0.05$) de funciones moleculares y celulares que se modifican significativamente después del agotamiento de p53 mutante, analizadas mediante análisis de rutas de Ingenuity (Ingenuity Systems, www.ingenuity.com).

10 La Figura 2C es un gráfico de cribado del ensayo de invasión uno a uno. Cuantificación de células KPC invadidas infectadas con agrupaciones de ARNph individuales (promedio de 3.6 ARNph por gen) dirigidas a los 40 principales genes sobrerregulados identificados por ARNseq. Los tres genes que anulaban la invasión de manera más eficiente están marcados en negro.

15 La Figura 2D es un gráfico de qRT-PCR para PDGFRb en células KPC+sh.p53 (1 o 2) o +sh.Ctrl. Los datos representan la expresión media normalizada de PDGFRb \pm DE de muestras por triplicado. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos repetidos.

20 La Figura 2E representa el análisis de transferencia Western de PDGFRb y p53 en células KPC que expresan sh.p53 (1 o 2) o sh.Ctrl. Las dos bandas de PDGFRb representan formas diferencialmente glicosiladas de la proteína. La expresión de actina se utilizó como control de carga.

25 La Figura 3A es un gráfico de los niveles de PDGFRA, PDGFRb y actina de las células KPC infectadas con ARNph que se dirigen a PDGFRA, PDGFRb o un control no dirigido (Ctrl) de acuerdo con lo determinado por la transferencia Western.

30 La Figura 3B es un gráfico de cuantificación de la invasión en colágeno de líneas celulares de la Figura 3A, en comparación con KPC+sh.p53. Los valores son las medias \pm DE de 9 réplicas de un experimento representativo. ** y *** indica $p < 0.005$ y $p < 0.001$, respectivamente, de acuerdo con lo determinado por la prueba t de Student.

35 La Figura 3C es un gráfico de qRT-PCR para PDGFRb en 21 líneas celulares de cáncer de páncreas humano de diferente estado de p53. Los datos representan la expresión de la media normalizada de PDGFRb \pm DE de muestras por triplicado.

40 La Figura 3D (panel superior) es un gráfico de qRT-PCR para PDGFRb en las líneas celulares de cáncer de páncreas humano Miapaca2, BXPC3, CFPAC y A2.1 que expresa un ARNph dirigido a p53 o un control no dirigido (Ctrl). Los datos representan la expresión de la media normalizada de PDGFRb \pm DE de muestras por triplicado de un experimento representativo. * y *** indican $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente. Estado de mutación de p53 en cada línea celular como se indica. La Figura 3D (panel inferior) representa los niveles de p53 de las poblaciones de células indicadas determinadas por transferencia Western. Se utilizó actina como control de carga.

45 La Figura 3E (panel derecho) es un gráfico de cuantificación de las células A2.1 humanas invadidas infectadas con ARNph que se dirigen a PDGFRb, p53 o para un control no dirigido (Ctrl). Los valores son las medias \pm DE de 9 réplicas de un experimento representativo. La Figura 3E (panel izquierdo) son reconstrucciones tridimensionales representativas de células invadidas infectadas con constructos como se indica. Las células se tiñeron para F-actina (rojo) y DAPI (azul); la línea discontinua indica la posición aproximada de la membrana Transwell; La flecha indica la dirección del movimiento.

50 La Figura 4A representa transferencias Western de células KP_{fl}C que expresan de manera estable un control de GFP o un vector p53 mutante (175H o 273H) que se transfectaron con HA.TAp73 α . Tanto p53 como HA se inmunoprecipitaron y se determinó la expresión de HAp73, p53 mutante o NF-YB tanto en la entrada (10% de lisados) como en la inmunoprecipitación.

55 La Figura 4B es un gráfico de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) que usa anticuerpos NF-YB en células KP_{fl}C que expresan de forma estable shCtrl, shNF-Y o HAp73. Los valores son las medias \pm DE.

60 La Figura 4C es un gráfico de células KP_{fl}C que expresan de forma estable un control de GFP, HAp73, sh.p73 (1 o 2), o un vector p53 mutante (175H o 273H) que se cotransfectaron con el constructo PDGFRB-promotor-luciferasa y el vector de luciferasa de renilla. La expresión de luciferasa de luciérnaga se determinó y se mostró como unidades relativas de luciferasa de luciérnaga (Fluc) normalizadas por expresión de renilla (Rluc). La actividad de luciferasa de luciérnaga de los lisados celulares que expresan el vector de control de GFP se estableció en 1. Los valores son la media de la actividad promotora \pm DE de muestras por cuadruplicado. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos repetidos.

65

- 5 La Figura 4D es un gráfico de células KPC que expresan el vector de control de GFP junto con sh.Ctrl, así como las células KPC que expresan establemente el constructo HAp73 junto con sh.Ctrl, sh.NF-YA (1 o 2), o sh.NF-YB (1 o 2) que se cotransfectaron con el constructo PDGFRB-promotor-luciferasa y el vector luciferasa de renilla. La actividad de luciferasa se midió como se describe en la Figura 4C.
- 10 La Figura 4E es un gráfico de cuantificación de la invasión de las mismas células que en la Figura 4C. Los valores son las medias \pm DE de 9 réplicas de un experimento representativo.
- 15 La Figura 4F es un gráfico de cuantificación de la invasión de las mismas células que en la Figura 4D. Los valores son las medias \pm DE de 9 réplicas de un experimento representativo.
- 20 La Figura 4G es una representación esquemática que resume un mecanismo de acción propuesto de p53 mutante en la promoción de un fenotipo invasivo de cáncer de páncreas.
- 25 La Figura 5A (panel izquierdo) es un gráfico de ensayos de colonización pulmonar después de la inyección de células KPC agotadas en PDGFRA, PDGFRb (1 o 2), p53 y control. El número total de nódulos metastásicos de pulmón en ratones individuales se contó sobre secciones histológicas seriales (al menos seis ratones por cada grupo). Los datos se representan como la media \pm DE. La Figura 5A (panel derecho) son imágenes representativas combinadas de campo claro/GFP de pulmón completo de ratones indicados.
- 30 La Figura 5B es un gráfico del ensayo MTS (E_{490}) de células KPC murinas y células A2.1 humanas tratadas con crenolanib con varias dosis durante 72 horas. Los valores normalizados se expresan como las medias \pm DE de réplicas por cuadruplicado.
- 35 La Figura 5C representa la inmunoprecipitación de PDGFRb de células KPC privadas de alimento durante 12 horas, tratadas con dosis crecientes de crenolanib o DMSO durante 4 horas y posteriormente estimuladas con 50 ng/mL de proteína recombinante PDGF-BB. Los niveles de proteína de PDGFRb, fosfo-tirosina y tubulina se determinaron mediante transferencia Western.
- 40 La Figura 5D (panel izquierdo) es un gráfico de cuantificación de la invasión de KPC murinas y A2.1 humanas tratadas ya sea con DMSO o crenolanib a 300 nM. Los valores son las medias \pm DE de 9 réplicas de un experimento representativo. La Figura 5D (panel derecho) son reconstrucciones tridimensionales representativas de células invadidas infectadas con constructos como se indica. Las células se tiñeron con F-actina (rojo) y DAPI (azul); la línea discontinua indica la posición aproximada de la membrana Transwell; La flecha indica la dirección del movimiento.
- 45 La Figura 5E (panel izquierdo) son imágenes representativas fusionadas de campo claro/GFP de pulmón completo, así como tinciones con H&E de secciones representativas de lóbulos pulmonares después de la inyección en la vena de la cola de células KPC tratadas con crenolanib o DMSO en ratones. La Figura 5E (panel derecho) es un gráfico de cuantificación del número total de nódulos metastásicos pulmonares en ratones individuales (al menos seis ratones por cada grupo). Los datos se representan como la media \pm DE.
- 50 La Figura 6A representa la inmunoprecipitación de PDGFRb a partir de células KPC privadas de alimento durante 12 horas, tratadas con dosis crecientes de imatinib o DMSO durante 4 horas y posteriormente estimuladas con 50 ng/mL de proteína recombinante PDGF-BB. Los niveles de proteína de PDGFRb, fosfo-tirosina y tubulina se determinaron mediante transferencia Western.
- 55 La Figura 6B representa los resultados de los ensayos de colonización pulmonar después de la inyección en la vena de la cola de células KPC tratadas con imatinib o DMSO. La Figura 6B (panel izquierdo) son imágenes representativas combinadas de campo claro/GFP de pulmón completo. La Figura 6B (panel central) son tinciones con H&E de secciones representativas de lóbulos pulmonares. Las flechas indican metástasis. La Figura 6B (panel derecho) es un gráfico de cuantificación del número total de nódulos metastásicos pulmonares en ratones individuales (al menos seis ratones por cada grupo). Los datos se representan como la media \pm DE.
- 60 La Figura 6C es un gráfico del peso de los tumores pancreáticos de ratones KPC tratados con portador o imatinib al momento de la muerte.
- La Figura 6D es un gráfico de cuantificación del número de ratones con enfermedad metastásica en el momento de la muerte. Los valores son porcentajes del número total de ratones en cada cohorte. Las columnas coloreadas representan ratones con metástasis (METS) y las columnas blancas representan animales libres de enfermedad (DF).
- La Figura 6E es un gráfico de cuantificación del número de ratones con enfermedad metastásica del pulmón, ganglios linfáticos o hígado en el momento de la muerte. Los valores son porcentajes del número total de ratones en cada cohorte. Las columnas coloreadas representan ratones con metástasis (METS) y las columnas blancas representan animales libres de enfermedad (DF).

La Figura 6F son tinciones con H&E de secciones representativas de órganos extraídos (tumor primario, pulmón, hígado, sistema linfático) de animales tratados con portador y con imatinib. Imágenes con un aumento de 10x y 40x (inserción).

5 La Figura 6G son imágenes representativas de inmunofluorescencia de tumores pancreáticos de ratones KPC tratados con portador o imatinib. DAPI, azul; CK8, rojo y p-PDGFRb, verde.

La Figura 7A son curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de 103 pacientes con cáncer de páncreas (variable clínica = DFS) en función de tumores que expresan PDGFRb-alto versus PDGFRb-bajo.

10 La Figura 7B es un diagrama de caja de expresión de PDGFRb versus grado tumoral de tumores pancreáticos

La Figura 7C es un gráfico del análisis clinicopatológico de la invasión del espacio vascular de pacientes con cáncer de páncreas estratificado por los niveles de expresión de PDGFRb en el tumor primario.

15 La Figura 7D es un gráfico de cuantificación de la expresión de pPDGFRb en muestras de PDAC humana estratificadas por niveles de expresión de p53. Los niveles de p53 y pPDGFRb fueron evaluados por IHC en un panel de TMA de cáncer pancreático humano (n = 961) y se puntuaron usando una escala relativa de 0 a 3.

20 La Figura 7E son curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con cáncer colorrectal (variable clínica = DFS) en función de tumores que expresan PDGFRb-alto versus PDGFRb-bajo.

La Figura 7F es un diagrama de caja de expresión de PDGFRb versus grado tumoral de tumores de colon.

25 La Figura 8A es un mapa de calor de genes significativamente cambiados (p_{adj} 0.05) después del agotamiento de p53 mutante, como se identifica por secuenciación de ARN. Se analizaron tres líneas celulares clonales individuales de KPC+sh.p53 y +sh.Ctrl y se marcaron los genes de puntuación superior representativos.

30 La Figura 8B representa el análisis de transferencia Western de las vías activadas del receptor b de PDGF secuencia abajo después de la inactivación de p53 mutante en células KPC. La expresión de actina se utilizó como control de carga.

35 La Figura 8C es un gráfico que representa rutas representativas en las células KPC. Las barras azules que cruzan la línea de umbral (p 0.05) representan las rutas de puntuación superior que se modifican significativamente en las células KPC agotadas en p53 mutante. Los datos se analizaron mediante el uso de análisis de rutas de Ingenuity.

40 La Figura 9A (panel izquierdo) es un gráfico de cuantificación de la invasión en colágeno de células KP_{fl}C no invasivas que expresan de forma estable un control de GFP, p53 mutante (175H o 273H) o vectores de ADNc de PDGFRb. Los valores son las medias \pm DE de 9 réplicas de un experimento representativo. ** y **** indican p 0.005 y p 0.0001, respectivamente, de acuerdo con lo determinado por la prueba t de Student. La Figura 9A (panel derecho) representa el análisis de transferencia Western de PDGFRb y p53 de las mismas células. La expresión de actina se utilizó como control de carga.

45 La Figura 9B es un gráfico del número de células a lo largo del tiempo de las células KPC que expresan de forma estable sh.Ctrl o sh.PDGFRb (1 o 2).

50 La Figura 9C es un gráfico de estudios de ARNi de selección negativa en células KPC que expresan de forma estable sh.Ctrl, sh.RPA3 o sh.PDGFRb (1 o 2) inducible por dox usando el sistema TRMPV tet-on. Los gráficos representan el porcentaje de células que expresan ARNph (Venus⁺ dsRed⁺) a lo largo del tiempo, normalizadas a la medición inicial 1 día después del tratamiento con dox.

55 La Figura 9D (panel izquierdo) es un esquema del ensayo de proliferación competitiva de doble color *in vivo* para evaluar los efectos de la supresión de PDGFRb mediada por ARNi en el crecimiento tumoral. Las células KPC se transdujeron con ARNph experimentales indicados (GFP⁺) y un ARNph de control neutro (Cherry⁺). La Figura 9D (panel derecho) es un gráfico del porcentaje de células que expresan ARNph experimental indicado (GFP⁺) o el ARNph de control neutro (Cherry⁺) en células previamente inyectadas y tumores 2 semanas después de la inyección. Los valores representan la media de múltiples líneas celulares previamente inyectadas o derivadas de tumores.

60 La Figura 10A (panel superior) es un gráfico de cuantificación de los niveles individuales de PDGFRb de 21 líneas celulares de cáncer de páncreas humano medido por qRT-PCR. Los datos representan la expresión de la media normalizada de PDGFRb \pm DE de muestras por triplicado. La Figura 10A (panel inferior) representa el análisis de transferencia Western para p53 de líneas celulares representativas.

65 La Figura 10B es un gráfico de cuantificación de la invasión en colágeno de células de cáncer de páncreas ASPC p53 -/- humano que expresan de forma estable un control de GFP o un vector de ADNc de PDGFRb. Los valores son las

medias \pm DE de 9 réplicas de un experimento representativo. *** indica $p < 0.001$ de acuerdo con lo determinado por la prueba t de Student.

5 La Figura 10C representa el análisis de transferencia Western de los niveles de PDGFRb y p53 en células de cáncer de páncreas, colon, pulmón y mama humano que expresan de forma estable sh.ARN o sh.p53 (1 o 2). La actina se utilizó como control de carga. La mutación p53 se da junto con el nombre de la línea celular.

10 La Figura 11A es un gráfico de qRT-PCR para c en células KPC+sh.p73 (1 o 2) o +sh.Ctrl. Los datos representan la media normalizada de la expresión de p73 \pm DE de muestras por triplicado. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos repetidos.

La Figura 11B representa los niveles de NF-YA, NF-YB y actina de células KP_nC infectadas con ARNph dirigidos a NF-YA, NF-YB o un control no dirigido (Ctrl) de acuerdo con lo determinado por la transferencia Western.

15 La Figura 11C es un gráfico de expresión de luciferasa de luciérnaga en células KPC. Después de una infección doble usando un control vacío o un vector HAp73 junto con sh.Ctrl, sh.p53 o sh.p73, las células KPC se cotransfectaron con el constructo *PDGFRB*-promotor-luciferasa y el vector de luciferasa de renilla. La expresión de luciferasa de luciérnaga se determinó y se mostró como unidades relativas de luciferasa de luciérnaga (Fluc) normalizadas por la expresión de renilla (Rluc). La actividad luciferasa de luciérnaga de los lisados celulares que expresan el vector de control de GFP se estableció en 1. Los valores son actividad promotora media \pm DE de muestras por cuadruplicado. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos repetidos.

25 La Figura 11D es un gráfico de expresión de luciferasa de luciérnaga en células KP_nC. Las células KP_nC que expresan de forma estable sh.Ctrl o sh.NF-YB junto con p53 mutante (175H o 273H) se cotransfectaron con el constructo *PDGFRB*-promotor-luciferasa y el vector de luciferasa de renilla. La actividad de luciferasa se midió como se describe en la Figura 11C.

30 La Figura 11E es un gráfico de cuantificación de la invasión de las mismas células que en la Figura 11C. Los valores son las medias \pm DE de 9 réplicas de un experimento representativo.

La Figura 11F es un gráfico de cuantificación de la invasión de las mismas células que en la Figura 11D. Los valores son las medias \pm DE de 9 réplicas de un experimento representativo.

35 La Figura 12A representan la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de secciones representativas de lóbulos pulmonares de ratones indicados después de la inyección en la vena de la cola de células KPC agotadas en PDGFRA, PDGFRb (1 o 2), p53 y control. Las flechas indican metástasis.

40 La Figura 12B es un gráfico del tamaño relativo del nódulo de metástasis pulmonar de ratones inyectados por vía intravenosa con células KPC agotadas en PDGFRA, PDGFRb (1 o 2), y control. Los datos se representan como la media \pm DE.

45 La Figura 12C representa la inmunohistoquímica de GFP en secciones histológicas de pulmón del ensayo de colonización pulmonar en la Figura 12B. La expresión de ARNph se correlaciona con la señal de GFP, ya que el marcador fluorescente está unido a la horquilla.

La Figura 12D representa la transferencia Western para fosfo-PDGFRb, PDGFRb y actina en células A2.1 humanas después del tratamiento con DMSO o crenolanib a diferentes dosis.

50 La Figura 12E representa la inmunoprecipitación de PDGFRb de células KPC tratadas con DMSO o crenolanib (300 nM) durante diferentes períodos de tiempo. Los niveles de proteína de entrada para PDGFRb, fosfo-tirosina y actina y los presentes en inmunoprecipitados para fosfo-tirosina se determinaron mediante transferencia Western.

55 La Figura 12F es un gráfico de la tinción con yoduro de propidio de células KPC tratadas durante la noche con DMSO, crenolanib (0.3 (Creno Low) o 25 μ M (Creno High)) o imatinib (3 μ M).

La Figura 12G (panel izquierdo) representa imágenes representativas fusionadas de campo claro/GFP de lóbulos pulmonares después de la inyección en la vena de la cola de células KP_nC tratadas con crenolanib o DMSO en ratones. La Figura 12G (panel central) representa tinciones con H&E de secciones representativas de lóbulos pulmonares.

60 La Figura 12G (panel derecho) es un gráfico de cuantificación del número total de nódulos metastásicos pulmonares en ratones individuales (al menos seis ratones por cada grupo). Los datos se representan como la media \pm DE.

La Figura 13A es un gráfico del ensayo MTS (E_{490}) de células KPC tratadas con imatinib con varias dosis durante 72 horas. Los valores normalizados se expresan como las medias \pm DE de réplicas por cuadruplicado.

65

La Figura 13B es un gráfico de cuantificación de la invasión de células KPC tratadas con DMSO o imatinib a 3 μ M. Los valores son las medias \pm DE de 9 réplicas de un experimento representativo.

5 La Figura 13C son curvas de supervivencia Kaplan-Meier de ratones tratados con portador o imatinib (50 mg/kg) a partir de las 8 semanas de edad.

La Figura 13D son imágenes representativas de campo claro del tumor pancreático, hígado, pulmón y sistema linfático de ratones KPC tratados con portador o imatinib. Las flechas negras denotan metástasis.

10 La Figura 13E es un gráfico de cuantificación de la intensidad de p-PDGFRb en tumores pancreáticos de ratones KPC tratados con portador o imatinib. p-PDGFRb se evaluó mediante inmunofluorescencia y su intensidad se calificó de 0 (niveles bajos de p-PDGFRb) a 3 (niveles altos de p-PDGFRb). Se analizaron 15 imágenes por tumor (n = 7).

15 La Figura 14A (panel izquierdo) es una tabla de estratificación de muestras de PDAC humanas basadas en niveles de expresión de p-PDGFRb y p53 altos y bajos. Se realizó la prueba de Chi-cuadrado. Los niveles de p-PDGFRb fueron determinados por IHC. La Figura 14A (panel derecho) representa imágenes representativas de IHC.

20 La Figura 14B son curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con cáncer colorrectal (variable clínica = DFS) en función de los niveles de expresión de los 40 genes de la firma del gen p53 mutante, PDGFRb, SLC40A1 y SNED1.

La Figura 14C son curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con cáncer de ovario (variable clínica = DFS). Los pacientes fueron estratificados como en la Figura 14B.

25 Definiciones

Para que la presente invención se entienda más fácilmente, ciertos términos se definen primero a continuación. Las definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se establecen a lo largo de la especificación.

30 *Porción característica*: como se usa en el presente documento, el término una "porción característica" de una sustancia, en el sentido más amplio, es una que comparte cierto grado de secuencia o identidad estructural con respecto a la sustancia completa. En ciertas realizaciones, una porción característica comparte al menos una característica funcional con la sustancia intacta. Por ejemplo, una "porción característica" de un polipéptido o proteína es una que contiene un tramo continuo de aminoácidos, o una colección de tramos continuos de aminoácidos, que
35 juntos son característicos de un polipéptido o proteína. En algunas realizaciones, cada tramo continuo de este tipo generalmente contiene al menos 2, 5, 10, 15, 20, 50 o más aminoácidos. En general, una porción característica de una sustancia (por ejemplo, de un polipéptido o proteína) es aquella que, además de la secuencia y/o identidad estructural especificada anteriormente, comparte al menos una característica funcional con la sustancia intacta relevante. En algunas realizaciones, una porción característica puede ser biológicamente activa.

40 *Secuencia característica*: una "secuencia característica" es una secuencia que se encuentra en todos los miembros de una familia de polipéptidos o ácidos nucleicos y, por lo tanto, puede ser utilizada por los expertos en la técnica para definir miembros de la familia.

45 *Terapia de combinación*: el término "terapia de combinación", como se usa en el presente documento, se refiere a aquellas situaciones en las que dos o más agentes farmacéuticos diferentes se administran en regímenes superpuestos para que el sujeto esté expuesto simultáneamente a ambos agentes. Cuando se usa en terapia de combinación, se pueden administrar dos o más agentes diferentes simultáneamente o por separado. Esta administración en combinación puede incluir la administración simultánea de los dos o más agentes en la misma forma de dosificación, administración simultánea en formas de dosificación separadas y administración separada. Es decir,
50 dos o más agentes pueden formularse juntos en la misma forma de dosificación y administrarse simultáneamente. Alternativamente, se pueden administrar simultáneamente dos o más agentes, en donde los agentes están presentes en formulaciones separadas. En otra alternativa, se puede administrar un primer agente solo seguido de uno o más agentes adicionales. En el protocolo de administración separada, se pueden administrar dos o más agentes con unos minutos de diferencia, o unas pocas horas de diferencia, o unos pocos días de diferencia.

60 *Homología*: como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere a la relación general entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. En algunas realizaciones, las moléculas poliméricas se consideran "homólogas" entre sí, si sus secuencias son al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idénticas. En algunas realizaciones, las moléculas poliméricas se consideran "homólogas" entre sí, si sus secuencias son al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% similares.

65 *Identidad*: como se usa en el presente documento, el término "identidad" se refiere a la relación general entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas

de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. El cálculo del porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, se puede realizar alineando las dos secuencias para fines de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y segunda secuencias de ácido nucleico para una alineación óptima y las secuencias no idénticas pueden descartarse para fines de comparación). En ciertas realizaciones, la longitud de una secuencia alineada para fines de comparación es al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o sustancialmente 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Luego se comparan los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que debe introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el algoritmo de Meyers y Miller (CABIOS, 1989, 4: 11-17), que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0) usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede, alternativamente, determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG usando una matriz NWSgapdna.CMP.

p53 mutante: como se usa en el presente documento, el término "gen p53 mutante" o "polipéptido p53 mutante" se refiere a un gen o un polipéptido cuya secuencia de nucleótidos o aminoácidos incluye al menos una secuencia característica de y/o muestra al menos 99%, 98 %, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71% o 70% de identidad con un gen o polipéptido p53 de tipo silvestre descrito en el presente documento, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, un polipéptido p53 mutante comparte al menos una secuencia característica de y/o muestra el grado especificado de identidad de secuencia global con una de las secuencias de p53 establecidas en el presente documento (cada una de las cuales puede considerarse una p53 de "referencia"). En algunas realizaciones, un polipéptido p53 mutante como se describe en el presente documento comparte al menos una actividad biológica con un polipéptido p53 de referencia como se establece en el presente documento. En algunas realizaciones, un polipéptido p53 mutante no exhibe una actividad supresora de tumor p53 detectable. En algunas realizaciones, un gen o polipéptido p53 mutante difiere de un gen o polipéptido p53 de tipo silvestre en uno o más nucleótidos o residuos de aminoácidos.

Polipéptido PDGFRb: el término "polipéptido PDGFRb" o "polipéptido del receptor b del factor de crecimiento derivado de plaquetas" se refiere a un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos una secuencia característica de y/o muestra al menos 100%, 99%, 98%, 97 %, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71% o 70% de identidad con un polipéptido PDGFRb descrito en el presente documento, por ejemplo, la SEQ ID NO: 4. En la técnica se conoce una amplia variedad de secuencias de PDGFRb de moscas, vertebrados y mamíferos, tales como las descritas en el presente documento; en algunas realizaciones, un PDGFRb comparte al menos una secuencia característica de y/o muestra el grado especificado de identidad de secuencia global con una de las secuencias de PDGFRb establecidas en el presente documento (cada una de las cuales puede considerarse una PDGFRb de "referencia"). En algunas realizaciones, un PDGFRb como se describe en el presente documento comparte al menos una actividad biológica con un PDGFRb de referencia como se establece en el presente documento. En algunas de tales realizaciones, la actividad biológica compartida se refiere a la activación o inhibición de la ruta de señalización de PDGF.

Inhibidor de PDGFRb: El término "inhibidor de PDGFRb", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia que inhibe o reduce la expresión y/o actividad de un PDGFRb. En algunas realizaciones, un inhibidor de PDGFRb es una sustancia que inhibe la transcripción, expresión, unión, actividad o estabilidad de un PDGFRb y/o un ácido nucleico que codifica dicho PDGFRb.

Modulador de PDGFRb: El término "modulador de PDGFRb", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia que modula la actividad y/o expresión de un PDGFRb. En algunas realizaciones, un modulador de PDGFRb modula la transcripción, unión, actividad y/o estabilidad de un PDGFRb y/o un ácido nucleico que codifica dicho PDGFRb. En algunas realizaciones, un modulador de PDGFRb es un activador de PDGFRb. En algunas realizaciones, un modulador de PDGFRb es un inhibidor de PDGFRb.

Polipéptido: como se usa en el presente documento, un "polipéptido", en general, es una cadena de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico. En algunas realizaciones, un polipéptido puede incluir al menos 3-5 aminoácidos, cada uno de los cuales está unido a otros por medio de al menos un enlace peptídico. Los expertos en la técnica apreciarán que los polipéptidos a veces incluyen aminoácidos "no naturales" u otras entidades que, sin embargo, son capaces de integrarse en una cadena de polipéptidos, opcionalmente.

Proteína: como se usa en el presente documento, el término "proteína" se refiere a un polipéptido (es decir, una cadena de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos). Las proteínas pueden incluir fracciones diferentes a los aminoácidos (por ejemplo, pueden ser glicoproteínas, proteoglicanos, etc.) y/o pueden ser procesados

o modificados de otro modo. Los expertos en la técnica apreciarán que una "proteína" puede ser una cadena polipeptídica completa producida por una célula (con o sin una secuencia señal), o puede ser una porción característica de la misma. Los expertos en la técnica apreciarán que una proteína a veces puede incluir más de una cadena polipeptídica, por ejemplo unida por uno o más enlaces disulfuro o asociada por otros medios. Los polipéptidos pueden contener L-aminoácidos, D-aminoácidos o ambos y pueden contener cualquiera de una variedad de modificaciones de aminoácidos o análogos conocidos en la técnica. Las modificaciones útiles incluyen, por ejemplo, acetilación terminal, amidación, metilación, etc. En algunas realizaciones, las proteínas pueden comprender aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, aminoácidos sintéticos y combinaciones de los mismos. El término "péptido" se usa generalmente para referirse a un polipéptido que tiene una longitud de menos de aproximadamente 100 aminoácidos, menos de aproximadamente 50 aminoácidos, menos de 20 aminoácidos o menos de 10 aminoácidos.

Muestra de referencia: tal como se usa en el presente documento, una muestra de referencia puede incluir, entre otros, cualquiera o todos los siguientes: una célula o células, una porción de tejido, sangre, suero, ascitis, orina, saliva y otros fluidos corporales, secreciones o excreciones. El término "muestra" también incluye cualquier material derivado del procesamiento de dicha muestra. Las muestras derivadas pueden incluir moléculas de nucleótidos o polipéptidos extraídos de la muestra u obtenidos sometiendo la muestra a técnicas tales como amplificación o transcripción inversa de ARNm, etc.

Sujeto: como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier organismo sobre el cual se pueden usar o administrar realizaciones de la invención, por ejemplo, con fines experimentales, diagnósticos, profilácticos y/o terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y humanos; insectos, gusanos, etc.).

Que padece: un individuo que "padece" una enfermedad, trastorno o afección (por ejemplo, un cáncer) ha sido diagnosticado y/o muestra uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. En algunas realizaciones, un individuo que padece cáncer tiene cáncer, pero no muestra ningún síntoma de cáncer y/o no ha sido diagnosticado con un cáncer.

Susceptible a: un individuo que es "susceptible" a una enfermedad, trastorno o afección (por ejemplo, cáncer) está en riesgo de desarrollar la enfermedad, trastorno o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno o afección no muestra ningún síntoma de la enfermedad, trastorno o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno o afección no ha sido diagnosticado con la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno o afección es un individuo que muestra afecciones asociadas con el desarrollo de la enfermedad, trastorno o afección. En algunas realizaciones, el riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno y/o afección es un riesgo con base en la población.

Los síntomas se reducen: de acuerdo con la presente invención, los "síntomas se reducen" cuando uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno o afección particular se reducen en magnitud (por ejemplo, intensidad, gravedad, etc.) o frecuencia. Para propósitos de claridad, un retraso en la aparición de un síntoma particular se considera una forma de reducir la frecuencia de ese síntoma. No se pretende que la presente invención se limite solo a los casos en que se eliminan los síntomas. La presente invención contempla específicamente el tratamiento de modo que uno o más síntomas se reduzcan (y la afección del sujeto se "mejore"), aunque no se elimine por completo.

Célula objetivo o tejido objetivo: tal como se usa en el presente documento, los términos "célula objetivo" o "tejido objetivo" se refieren a cualquier célula, tejido u organismo afectado por una afección descrita en el presente documento y que se va a tratar, o cualquier célula, tejido o organismo en el que se expresa una proteína implicada en una afección descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, las células objetivo, tejidos objetivo u organismos objetivo incluyen aquellas células, tejidos u organismos en los que hay una cantidad detectable o anormalmente alta de actividad y/o expresión de PDGFRb (por ejemplo, comparable a la observada en sujetos que padecen o son susceptible de padecer cáncer). En algunas realizaciones, las células objetivo, los tejidos objetivo o los organismos objetivo incluyen aquellas células, tejidos u organismos que muestran una patología, síntoma o característica asociada a la enfermedad.

Régimen terapéutico: como se usa en este documento, el término "régimen terapéutico" se refiere a cualquier método utilizado para aliviar, mejorar, mitigar, inhibir, prevenir, retrasar el inicio, reducir la gravedad de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección en particular. Puede incluir un tratamiento o una serie de tratamientos diseñados para lograr un efecto particular, por ejemplo, reducción o eliminación de una afección o enfermedad perjudicial como el cáncer. El tratamiento puede incluir la administración de uno o más compuestos de forma simultánea, secuencial o en diferentes momentos, por la misma o diferentes cantidades de tiempo. Alternativamente, o adicionalmente, el tratamiento puede incluir exposición a radiación, agentes quimioterapéuticos, terapia hormonal o cirugía. Además, un "régimen de tratamiento" puede incluir métodos genéticos tales como terapia génica, ablación génica u otros métodos conocidos para reducir la expresión de un gen particular o la traducción de un ARNm derivado de un gen.

Agente terapéutico: como se usa en el presente documento, la frase "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que, cuando se administra a un sujeto, tiene un efecto terapéutico y/o provoca un efecto biológico y/o farmacológico deseado.

5 *Cantidad terapéuticamente eficaz*: como se usa en este documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente (por ejemplo, un modulador de PDGFRb) que confiere un efecto terapéutico en el sujeto tratado, a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible por alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación o siente un efecto). En particular, la "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico o composición eficaz para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable, tal como al mejorar los síntomas asociados con la enfermedad, previniendo o retrasando la aparición de la enfermedad, y/o también disminuyendo la severidad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz se administra comúnmente en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier agente terapéutico particular, una cantidad terapéuticamente eficaz (y/o una dosis unitaria apropiada dentro de un régimen de dosificación efectivo) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. Además, la cantidad terapéuticamente eficaz específica (y/o dosis unitaria) para cualquier paciente en particular puede depender de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se trata y la gravedad del trastorno; la actividad del agente farmacéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto; el tiempo de administración, la ruta de administración y/o la tasa de excreción o metabolismo de la proteína de fusión específica empleada; la duración del tratamiento; y factores similares como es bien conocido en las artes médicas.

25 *Tratamiento*: como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" (también "tratar" o "que se trata") se refiere a cualquier administración de una sustancia (por ejemplo, composiciones proporcionadas) que alivia, mejora, mitiga, inhibe, retrasa de forma parcial o completa el inicio, reduce la gravedad y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas, características y/o causas de una enfermedad, trastorno y/o afección en particular (por ejemplo, cáncer). Tal tratamiento puede ser de un sujeto que no muestra signos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante y/o de un sujeto que exhibe solo signos tempranos de la enfermedad, trastorno y/o afección. Alternativa o adicionalmente, dicho tratamiento puede ser de un sujeto que exhibe uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser de un sujeto que ha sido diagnosticado que padece la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser de un sujeto que se sabe que tiene uno o más factores de susceptibilidad que se correlacionan estadísticamente con un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección relevantes.

35 *p53 de tipo silvestre*: como se usa en el presente documento, el término "p53 de tipo silvestre" se refiere a un gen p53 ("gen p53 de tipo silvestre") o polipéptido p53 ("polipéptido p53 de tipo silvestre") que existe en un organismo y que tiene una o más funciones conocidas de p53, por ejemplo, actividad represiva tumoral. En la técnica se conoce una amplia variedad de secuencias de p53 de moscas, vertebrados y mamíferos, tales como las descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, un gen p53 de tipo silvestre humano tiene o incluye la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, y un polipéptido p53 de tipo silvestre humano tiene o incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Descripción detallada

45 La presente descripción abarca el sorprendente descubrimiento de que la metástasis tumoral, por ejemplo, metástasis de un tumor que expresa un polipéptido p53 mutante, puede modularse usando moduladores de PDGFRb (por ejemplo, activadores o inhibidores de PDGFRb). En consecuencia, la divulgación proporciona, entre otras cosas, el uso de PDGFRb como un objetivo de diagnóstico, pronóstico o terapéutico para tratar el cáncer, por ejemplo, un tumor que expresa un polipéptido p53 mutante.

p53 de tipo silvestre y mutante

55 Las mutaciones en el gen supresor de tumores p53 representan las lesiones genéticas más comunes en el cáncer (Vogelstein et al., 2000). Los estudios funcionales indican que el p53 de tipo silvestre posee una serie de actividades antiproliferativas que limitan la proliferación y supervivencia de las células premalignas. p53 ejerce estas actividades, al menos en parte, a través de su capacidad para unirse al ADN de una manera específica de la secuencia para regular la expresión génica, y la gran mayoría de las mutaciones que se producen en los tumores humanos desactivan esta propiedad de la p53 y, en consecuencia, sus efectos anti proliferativos.

60 Las mutaciones de p53 típicamente ocurren dentro de la región de unión al ADN e involucran residuos de contacto con el ADN o residuos importantes para la estructura conformacional, ambos resultando en la pérdida de la unión del ADN (Rolley et al., 1995). Debido a que p53 funciona como un factor de transcripción tetramérico (Wang et al., 1994), las mutaciones de p53 mono-alélicas pueden ejercer efectos dominantes negativos sobre una proteína p53 de tipo silvestre coexpresada. p53 activa las ubiquitinas ligasas E3 que se retroalimentan para provocar la destrucción de p53 y su rápida rotación; sin embargo, los mutantes sin sentido de p53 defectuosos en la regulación de la expresión génica

conducen a la acumulación estable de las proteínas variantes (Oren et al., 2010). Curiosamente, los ratones genéticamente modificados que albergan mutaciones puntuales comunes de p53 desarrollan tumores más agresivos y metastásicos en comparación con los que surgen en sus homólogos p53 heterocigotos o nulos (Lui et al., 2000; Lang et al., 2004; Olive et al., 2004), sugiriendo que las formas mutantes de p53 ejercen actividades de ganancia de función independientemente de sus efectos sobre p53 de tipo silvestre. Por lo tanto, la inactivación de la actividad de p53 no solo está estrechamente relacionada con el desarrollo de estados cancerosos, sino que las mutaciones de p53 que se producen en algunos cánceres pueden conducir a una mayor expresión de proteínas de p53 mutante que promueven activamente el cáncer. Esta ganancia de función puede deberse a la capacidad de los mutantes de p53 para mejorar la invasión celular y promover la metástasis. Los tumores humanos con p53 mutante están asociados con un mal pronóstico para el paciente (Sorlie et al., 2001; Soussi y Beroud, 2001) y resistencia a los medicamentos (Masciarelli et al., 2013). Además, las proteínas p53 mutantes se han identificado como involucradas en el reciclaje de integrinas (Muller et al., 2009), la ruta del mevalonato (Freed-Pastor et al., 2012) o la biogénesis de miARN (Su et al., 2010).

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es un tipo de cáncer en el que el p53 mutante afecta la progresión de la enfermedad. El PDAC surge de adenomas intraductales pancreáticos indolentes (PanIN) que con frecuencia pasan desapercibidos y persisten durante muchos años. Sin embargo, la conversión de PanIN a PDAC altamente agresivos, francamente invasivos y metastásicos, en los que el p53 está mutado en el 75% de los casos, tiene un pronóstico grave debido a la detección en etapa tardía, la presencia de metástasis y opciones de tratamiento ineficaces (Li et al., 2004). Incluso aquellos pacientes con una lesión pancreática quirúrgicamente abordable desarrollan enfermedad recurrente y metastásica después de la resección tumoral local (Hidalgo, 2010). De acuerdo con un papel para el p53 mutante en este proceso, los ratones que albergan cánceres pancreáticos provocados por *Kras* oncogénico y un alelo p53 mutante muestran más metástasis en comparación con los ratones idénticos que albergan un alelo nulo p53. Sin embargo, no se sabía previamente si se necesita p53 mutante para mantener el fenotipo metastásico y cómo se regula. Como la metástasis es una causa importante de mortalidad por cáncer, y las mutaciones de p53 son comunes, los agentes que previenen o reducen la metástasis al interferir con los efectos de p53 mutante tienen un gran potencial. Como se describe en el presente documento, la presente descripción incluye el descubrimiento del receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRb) según sea necesario y suficiente para mediar los efectos de p53 mutante sobre la invasión y la metástasis.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente descripción implican la identificación y/o el tratamiento de tumores que tienen y/o expresan uno o más genes p53 mutantes. Se conocen los genes y polipéptidos p53 mutantes y de tipo silvestre. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de tipo silvestre humano se describe como el número de acceso AB082923.1 del GenBank (SEQ ID NO: 1), y la secuencia de aminoácidos correspondiente se describe como el número de acceso BAC16799.1 del GenBank (SEQ ID NO: 2) En algunas realizaciones, un polipéptido p53 de tipo silvestre incluye un polimorfismo de prolina/arginina en el residuo de aminoácido 72 y el correspondiente polimorfismo de nucleótido.

El número de registro P04637 en la base de datos UniProt enumera mutaciones en la secuencia de aminoácidos de un p53 humano de tipo silvestre. En algunas realizaciones, un polipéptido p53 mutante contiene una mutación de al menos un residuo de aminoácido de tipo silvestre seleccionado de V143, P151, R175, G245, R248, R249, R273, P274, R280 y R282 de un polipéptido p53 de tipo silvestre descrito en el presente documento, por ejemplo, de la SEQ ID NO: 1 (o un residuo de aminoácido de tipo silvestre correspondiente de un polipéptido p53 de tipo silvestre de otra especie). En algunas realizaciones, un polipéptido p53 mutante incluye al menos una mutación de aminoácidos seleccionada de V143A, P151S, R175H, P223L, M237I, G245C, G245H, G245S, R273H, P274L y R280K y/o cualquier combinación de los mismos. Se describen polipéptidos mutantes p53 adicionales en, por ejemplo, Bai et al., *J. Cancer Mol.*, 2 (4): 141-153 (2006).

En algunas realizaciones, un polipéptido p53 mutante incluye una mutación de uno o más residuos de aminoácidos de tipo silvestre seleccionados de los residuos de aminoácidos 130-290 (véase, por ejemplo, Nigro et al., *Nature* 342, 705-708 (1989)) En algunas realizaciones, un polipéptido p53 mutante es una mutación de uno o más residuos de aminoácidos de tipo silvestre seleccionados de los residuos de aminoácidos 132-143, 174-179, 236-248 y 272-281.

En algunas realizaciones, un polipéptido p53 mutante tiene al menos una mutación de un residuo de aminoácido de tipo silvestre de un dominio del terminal N de p53 (por ejemplo, de aproximadamente 1-42 aminoácidos). En algunas realizaciones, un polipéptido p53 mutante tiene al menos una mutación de un residuo de aminoácido de tipo silvestre de un dominio de activación de p53 (por ejemplo, de aproximadamente 43-63 aminoácidos). En algunas realizaciones, un polipéptido p53 mutante tiene al menos una mutación de un residuo de aminoácido de tipo silvestre de un dominio rico en proteína p53 (por ejemplo, de aproximadamente 64-92 aminoácidos). En algunas realizaciones, un polipéptido p53 mutante tiene al menos una mutación de un residuo de aminoácido de tipo silvestre de un dominio de unión a ADN de p53 (por ejemplo, de aproximadamente 100-300 aminoácidos). En algunas realizaciones, un polipéptido p53 mutante tiene al menos una mutación de un residuo de aminoácido de tipo silvestre de un dominio de señalización de localización nuclear de p53 (por ejemplo, de aproximadamente 316-325 aminoácidos). En algunas realizaciones, un polipéptido p53 mutante tiene al menos una mutación de un residuo de aminoácido de tipo silvestre de un dominio de homo-oligomerización de p53 (por ejemplo, de aproximadamente 307-355 aminoácidos). En algunas realizaciones, un polipéptido p53 mutante tiene al menos una mutación de un residuo de aminoácido de tipo silvestre de un dominio del terminal C de p53 (por ejemplo, de aproximadamente 356-393 aminoácidos). En algunas realizaciones, un polipéptido

p53 mutante tiene una mutación de uno o más residuos de aminoácidos de tipo silvestre en uno o más dominios de p53 descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, se describen el presente documento métodos de la presente divulgación que implican la identificación y/o tratamiento de tumores que tienen una o más secuencias de nucleótidos de p53 mutante, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica para uno o más polipéptidos p53 mutantes. Se describen secuencias de nucleótidos de p53 mutantes adicionales en, por ejemplo, Levine et al., Nature 351: 453-456 (1991).

Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es producido por varios tipos de células, incluidas las plaquetas (véase, por ejemplo, Bowen-Pope et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 31: 2397-401, doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179556 (2011)). PDGF es un mitógeno para células mesenquimalmente derivadas, tales como células sanguíneas, de músculo, de hueso/cartilago y de tejido conectivo. Se conocen al menos tres formas de PDGF. Cada forma consiste en una combinación homo o heterodimérica de 30 kDa de dos cadenas de polipéptidos genéticamente distintas, pero estructuralmente relacionadas, que se designan cadenas A y B, respectivamente. Cada cadena se sintetiza como un propéptido, existen variantes de empalme para la cadena A, y el procesamiento proteolítico del terminal C se produce para la cadena B y quizás la cadena A.

Varias células diferentes expresan PDGF, incluyendo fibroblastos, células endoteliales, osteoblastos, plaquetas, células de músculo liso vascular, macrófagos y células de Langerhans, y fibroblastos fetales. PDGF es miembro de una familia más grande de factores. Además del PDGF, esta familia incluye los factores homodiméricos VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y PIGF (factor de crecimiento placentario), heterodímeros VEGF/PIGF y CTGF (factor de crecimiento del tejido conectivo), un factor similar del PDGF secretado por células endoteliales vasculares humanas y fibroblastos.

Se conocen al menos dos proteínas distintas de unión transmembrana del receptor del PDGF humano, un receptor alfa del residuo del aminoácido 1066 de 170 kDa (PDGFR alfa o PDGFRa) y un receptor beta del residuo del aminoácido 1074 de 190 kDa (PDGFR beta o PDGFRb) (véase, por ejemplo, Yu et al., J. Biochem. Mol. Biol. 36: 49-59 (2003)). Las dos proteínas receptoras están estructuralmente relacionadas y consisten en una porción extracelular que contiene cinco dominios de tipo inmunoglobulina, una sola región transmembrana y una porción intracelular con un dominio de proteína-tirosina quinasa. Una secuencia de nucleótidos de un PDGFRb humano se describe como el número de acceso NM_002609.3 del GenBank (SEQ ID NO: 3), y la secuencia de aminoácidos traducida se establece como el número de acceso NP_002600.1 del GenBank (SEQ ID NO: 4).

Un receptor de PDGF funcional se forma cuando dos cadenas de una molécula de PDGF dimérica se unen cada una a un receptor, dando como resultado su aproximación, dimerización y activación. La unión de alta afinidad de PDGF implica la dimerización de los receptores, formando homodímeros o heterodímeros con los receptores/cadenas alfa y beta. El PDGFR alfa se une a cada una de las tres formas de dímeros del PDGF con alta afinidad. Aunque PDGFR beta se une a PDGF-BB y PDGF-AB con alta afinidad, no se une a PDGF-AA.

Las células que se sabe que expresan solo receptores alfa incluyen progenitores oligodendrogiales, células endoteliales del hígado y mesotelio, y plaquetas. Las células que expresan solo receptores beta incluyen el endotelio capilar del SNC, las neuronas y las células Ito (de almacenamiento de grasa) del hígado, además de monocitos/macrófagos. Las células que muestran la expresión coincidente de los receptores alfa y beta incluyen las células del músculo liso, los fibroblastos y las células de Schwann.

Los receptores del PDGF son receptores de tirosina quinasa, y la unión del receptor por PDGF activa la tirosina quinasa intracelular, lo que conduce a la autofosforilación del dominio citoplasmático del receptor, así como a la fosforilación de otros sustratos intracelulares. Los sustratos específicos identificados con el receptor beta incluyen Src, proteína activadora de GTPasa (GAP), fosfolipasa C gamma (PLC gamma) y fosfatidilinositol 3-fosfato. Además, también se puede activar una vía de transducción de la señal no asociada a la fosforilación de tirosina que involucra la proteína de dedo de zinc erg-1 (gen 1 de respuesta de crecimiento temprano).

Métodos de diagnóstico

Ciertos métodos de la presente descripción utilizan la presencia y/o nivel de expresión de un gen p53 mutante como un biomarcador para el uso de un inhibidor de PDGFRb descrito en este documento. En algunas realizaciones, se proporciona un método para determinar la probabilidad de que un tumor pueda tratarse eficazmente con un inhibidor de PDGFRb. Tales métodos pueden incluir determinar la presencia y/o nivel de expresión y/o actividad de un gen p53 mutante en una muestra de tumor obtenida de un sujeto; y con base en la presencia y/o nivel de expresión y/o actividad de un gen p53 mutante, determinar que la muestra tumoral tiene una mayor o menor probabilidad, en relación con la referencia, de ser tratada efectivamente con un inhibidor de PDGFRb.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión y/o actividad de un PDGFR, por ejemplo, un PDGFRb, se usa como un biomarcador para el uso de un inhibidor de PDGFRb descrito en el presente documento. En algunas realizaciones,

un nivel de expresión y/o actividad de un PDGFR, por ejemplo, un PDGFRb, en un tumor, por ejemplo, una muestra de tumor, que es mayor que un control indica que el tumor puede tratarse eficazmente con un inhibidor de PDGFRb. En algunas realizaciones, un control es el nivel de actividad y/o expresión de PDGFRb en una célula, tejido o muestra biológica no tumoral correspondiente. Por ejemplo, un nivel de expresión y/o actividad de un PDGFRb en un tumor de 5 cáncer pancreático, colorrectal u ovárico se puede comparar con el nivel de expresión y/o actividad de un PDGFRb en células o tejido pancreático, colorrectal u ovárico no tumoral. En algunas realizaciones, un nivel de expresión y/o actividad de un PDGFRb en un tumor de cáncer pancreático, colorrectal u ovárico que es más alto en relación con el nivel de expresión y/o actividad de un PDGFRb en células o tejido pancreático, colorrectal u ovárico no tumoral indica que el tumor puede tratarse eficazmente con un inhibidor de PDGFRb descrito en el presente documento. En algunas 10 realizaciones, si un nivel de expresión y/o actividad de un PDGFRb en un tumor de cáncer pancreático, colorrectal u ovárico es mayor en relación con el nivel de expresión y/o actividad de un PDGFRb en células o tejido pancreático, colorrectal u ovárico no tumoral, el tumor se trata con un inhibidor de PDGFRb descrito en el presente documento.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para determinar la expresión de ARNm de p53 mutante, los 15 niveles o actividad del polipéptido y correlacionar los resultados obtenidos con una probabilidad de tratamiento efectivo con un inhibidor de PDGFRb, y/o seleccionar un sujeto para tratamiento con un Inhibidor de PDGFRb. En otro aspecto, la divulgación incluye un método para determinar la expresión y/o actividad de PDGFRb en un tumor y correlacionar los resultados con la probabilidad de un tratamiento efectivo con un inhibidor de PDGFRb, y/o seleccionar un sujeto para el tratamiento con un inhibidor de PDGFRb. Generalmente, los métodos incluyen una etapa para detectar la 20 presencia, expresión y/o actividad de un gen que codifica un polipéptido p53 mutante, y/o detectar la expresión y/o actividad de PDGFRb. Los productos génicos pueden detectarse en una muestra de tumor y pueden ser polipéptidos o polinucleótidos, por ejemplo, ARNm.

Análisis de ácidos nucleicos

La detección de p53 mutante y/o la detección de PDGFRb a nivel de ácido nucleico está comprendida en las 25 realizaciones de la presente descripción. Los análisis de ácido nucleico se pueden realizar en ADN genómico, ARN mensajeros y/o ADNc. En muchas realizaciones, los ácidos nucleicos se extraen de una muestra biológica, por ejemplo, una muestra tumoral. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se analizan sin haber sido amplificados. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se amplifican usando técnicas conocidas en el arte (tales como la 30 reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) y los ácidos nucleicos amplificados se usan en análisis posteriores. Se puede emplear PCR multiplex, en la que se amplifican varios amplicones (por ejemplo, de diferentes regiones genómicas) a la vez usando múltiples conjuntos de pares de cebadores (véase en general, Bustin, SA, 2000 J. Molecular Endocrinology 25: 169-193). Las técnicas adicionales incluyen, pero no se limitan a, hibridación in situ, transferencia Northern y diversas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos tales como PCR, rtPCR, rtPCR 35 cuantitativa, y la reacción en cadena de la ligasa. La PCR y las consideraciones para el diseño del cebador son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Newton, et al., (eds.) PCR: Essential data Series, John Wiley & Sons; PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1995; White, et al., (Eds.) PCR Protocols: Current Methods and Applications, Methods in Molecular Biology, The Humana Press, Totowa, NJ, 1993. 40

Análisis de polipéptidos

Los polipéptidos p53 mutantes y/o los polipéptidos PDGFRb se pueden detectar usando cualquiera de una variedad 45 de técnicas y agentes de unión. En ciertas realizaciones, un agente de unión es un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido p53 mutante. La divulgación también abarca el uso de matrices de proteínas, incluyendo matrices de anticuerpos, para la detección de un polipéptido p53 mutante y/o un polipéptido PDGFRb. El uso de matrices de anticuerpos se describe, por ejemplo, en Haab et al., Genome Biol. 2 (2): 2001 (2001). Otros tipos de matrices de proteínas conocidas en la técnica son útiles en los métodos descritos. En general, los anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos p53 mutantes y/o polipéptidos PDGFRb pueden generarse mediante métodos 50 bien conocidos en la técnica y descritos, por ejemplo, en Harlow, E, Lane, E y Harlow, E, (eds.) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1998. Los detalles y referencias para la producción de anticuerpos también se pueden encontrar en la patente de los Estados Unidos No. 6.008.337. Los anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos (por ejemplo, "humanizados"), de cadena sencilla, fragmentos Fab, anticuerpos generados usando tecnología de presentación en fagos, etc. La invención abarca el uso de anticuerpos "completamente humanos" producidos usando la tecnología Xenomouse^{MR} (AbGenix Corp., Fremont, CA) de acuerdo con las técnicas descritas en la patente de los Estados 55 Unidos No. 6.075.181. Los métodos de detección de anticuerpos son bien conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, ensayos por inmunosorción ligado a enzimas (ELISA) y transferencias Western. Algunos de estos métodos son susceptibles de realizarse en un formato de matriz. 60

Además, en ciertas realizaciones de la divulgación, los polipéptidos p53 mutantes y/o polipéptidos PDGFRb se detectan usando otros agentes de unión específicos conocidos en la técnica para la detección de polipéptidos, tales como aptámeros (Aptamers, Molecular Diagnosis, vol. 4, No. 4, 1999), reactivos derivados de bibliotecas 65 combinatorias para la detección específica de proteínas en mezclas complejas, reactivos de afinidad de péptidos

aleatorios, etc. En general, cualquier agente de unión apropiado para detectar un polipéptido puede usarse junto con la presente invención, aunque los anticuerpos pueden representar una modalidad particularmente apropiada.

En ciertas realizaciones de la descripción, se usa un único agente de unión (por ejemplo, anticuerpo) mientras que en otras realizaciones de la invención se pueden usar múltiples agentes de unión, dirigidos ya sea contra los mismos o diferentes polipéptidos mutantes de p53 y/o polipéptidos PDGFRb para aumentar la sensibilidad o especificidad de la técnica de detección o para proporcionar información más detallada que la que proporciona un único agente de unión. Por lo tanto, la divulgación abarca el uso de una batería de agentes de unión que se unen a polipéptidos codificados por los genes p53 mutantes (y/o polipéptidos PDGFRb) descritos en el presente documento. En general, los polipéptidos se detectan dentro de una muestra tumoral que se ha obtenido de un sujeto, por ejemplo, una muestra de tejido, muestra celular, extracto celular, muestra de fluido corporal, etc.

En ciertas realizaciones, la unión puede detectarse agregando una etiqueta detectable a un agente de unión. En otras realizaciones, la unión se puede detectar usando un agente de unión secundario marcado que se asocie específicamente con un agente de unión primario, por ejemplo, como es bien conocido en la técnica de detección de antígeno/anticuerpo. Un marcador detectable puede ser directamente detectable o indirectamente detectable, por ejemplo, a través de la acción combinada con uno o más miembros adicionales de un sistema productor de señal. Los ejemplos de marcadores directamente detectables incluyen marcadores radiactivos, paramagnéticos, fluorescentes, de dispersión de luz, absorbentes y colorimétricos. Los marcadores indirectamente detectables incluyen marcadores quimioluminiscentes, por ejemplo, enzimas que son capaces de convertir un sustrato en un producto cromogénico como la fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y similares.

Una vez que un agente de unión marcado se ha unido a un polipéptido p53 mutante, el complejo puede visualizarse o detectarse de varias maneras, eligiéndose la manera particular de detección basándose en la etiqueta detectable particular. Los medios de detección representativos incluyen, por ejemplo, conteo de centelleo, autorradiografía, medición de paramagnetismo, medición de fluorescencia, medición de absorción de luz, medición de dispersión de luz y similares. Dependiendo de la naturaleza de la muestra, las técnicas de detección apropiadas incluyen, pero no se limitan a, inmunohistoquímica (IHC), radioinmunoensayo, ELISA, inmunotransferencia y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). En el caso de que el polipéptido se detecte en una muestra de tejido, por ejemplo, una muestra de biopsia, IHC es una técnica de detección particularmente apropiada.

En ciertas realizaciones, las técnicas de detección de la presente descripción incluyen un control negativo, que puede implicar la aplicación de análisis de una muestra de control (por ejemplo, de un tejido no canceroso normal) para que una señal obtenida de ese modo pueda compararse con una señal obtenida de una muestra tumoral que se está probando. En las pruebas en las que se usa un agente de unión secundario para detectar un agente de unión primario que se une al polipéptido de interés, un control negativo apropiado puede implicar realizar la prueba en una porción de la muestra con la omisión del agente de unión primario.

En general, los resultados de las técnicas de detección pueden presentarse en cualquiera de una variedad de formatos. Los resultados pueden presentarse de forma cualitativa. Por ejemplo, un informe de prueba puede indicar solo si se detectó o no un polipéptido p53 mutante particular, tal vez también con una indicación de los límites de detección. Los resultados pueden presentarse de forma semicuantitativa. Por ejemplo, se pueden definir varios intervalos, y se puede asignar una puntuación a los intervalos (por ejemplo, 0 a 3 cuando 0 significa que no se detectó unión y 3 significa unión fuerte detectada) que proporciona un cierto grado de información cuantitativa. Tal puntuación puede reflejar varios factores, por ejemplo, el número de células en las que se detecta un polipéptido, la intensidad de la señal (que puede indicar el nivel de expresión de un polipéptido), etc. Los resultados pueden presentarse de manera cuantitativa, por ejemplo, como un porcentaje de células en las que se detecta un polipéptido, tal como una concentración de proteína, etc.

Fracciones detectables

En ciertas realizaciones, ciertas moléculas (por ejemplo, sondas de ácido nucleico, anticuerpos, etc.) usadas de acuerdo con y/o proporcionadas por la divulgación comprenden una o más entidades o fracciones detectables, es decir, tales moléculas están "marcadas" con tales entidades o fracciones. Los ejemplos no limitantes de fracciones detectables incluyen, sin limitación, compuestos fluorescentes, diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, átomos de metal emisores fluorescentes (por ejemplo, europio (Eu)), isótopos radiactivos (descritos a continuación), puntos cuánticos, reactivos densos en electrones y haptenos. Las fracciones detectables se pueden detectar utilizando diversos medios, que incluyen, pero no se limitan a, medios espectroscópico, fotoquímico, radioquímico, bioquímico, inmunoquímico o químico.

Los ejemplos no limitantes de fracciones detectables fluorescentes incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Una fracción detectable también puede ser una enzima detectable, tal como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, acetilcolinesterasa, glucosa oxidasa y similares. Cuando un nanopolímero se derivatiza con una enzima detectable, se puede detectar agregando reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando la fracción detectable es peroxidasa de rábano picante, la adición de

peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado detectable. Un polipéptido también puede derivatizarse con un grupo protésico (por ejemplo, estreptavidina/biotina y avidina/biotina). Por ejemplo, un polipéptido puede derivatizarse con biotina y detectarse mediante medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Ejemplos no limitantes de compuestos fluorescentes que pueden usarse como fracciones detectables incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo y ficoeritrina. Los materiales luminiscentes incluyen, por ejemplo, luminol, y los materiales bioluminiscentes incluyen, por ejemplo, luciferasa, luciferina y aequorina.

Una fracción detectable también puede ser un isótopo radiactivo, tal como, pero no limitado a, emisores alfa, beta o gamma; o emisores beta y gamma. Los isótopos radiactivos se pueden usar en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Tales isótopos radiactivos incluyen, pero no se limitan a, yodo (^{131}I o ^{125}I), itrio (^{90}Y), lutecio (^{177}Lu), actinio (^{225}Ac), praseodimio (^{142}Pr o ^{143}Pr), astato (^{211}At), renio (^{186}Re o ^{187}Re), bismuto (^{212}Bi o ^{213}Bi), indio (^{111}In), tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), fósforo (^{32}P), rodio (^{188}Rh), azufre (^{35}S), carbono (^{14}C), tritio (^3H), cromo (^{51}Cr), cloro (^{36}Cl), cobalto (^{57}Co o ^{58}Co), hierro (^{59}Fe), selenio (^{75}Se) y galio (^{67}Ga).

Detección de mutaciones de p53

La divulgación también abarca la detección de mutaciones de un gen p53. Las mutaciones pueden incluir, pero sin limitarse a, eliminaciones, adiciones, sustituciones y amplificación de regiones de ADN genómico que incluyen todo o parte de un gen. Los métodos para detectar tales mutaciones son bien conocidos en la técnica e incluyen secuenciación directa, HPLC desnaturalizante y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Segal, NH et al., 2003, *Am J Pathol*, 163: 691-700; Visel, A. et al., 2009, *Nature*, 457: 854-858). Las mutaciones pueden provocar la sobreexpresión o la expresión inapropiada de p53 (es decir, expresión aberrante). Adicionalmente o alternativamente, las mutaciones pueden dar como resultado un producto génico demasiado activado (por ejemplo, polipéptido). Las mutaciones de p53 pueden analizarse mediante los ejemplos de métodos a continuación.

i. Amplificación específica de alelo

En algunas realizaciones, las mutaciones génicas se detectan usando un ensayo de amplificación específico de alelo. Este enfoque se conoce como amplificación por PCR de alelo específico (PASA) (Sarkar, et al., 1990 *Anal. Biochem.* 186: 64-68), amplificación específica de alelo (ASA) (Okayama, et al., 1989 *J Lab. Clin. Med.* 114: 105-113), PCR específica de alelo (ASPCR) (Wu, et al., 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 2757-2760), y sistema de mutación refractaria a la amplificación (ARMS) (Newton, et al., 1989 *Nucleic Acids Res.* 17: 2503-2516). Este método se puede utilizar para detectar sustituciones de bases individuales, así como micro eliminaciones/inserciones.

Por ejemplo, para los métodos de amplificación basados en PCR, los cebadores de amplificación pueden diseñarse de modo que puedan distinguir entre diferentes alelos (por ejemplo, entre un alelo de tipo silvestre y un alelo mutante). Por lo tanto, la presencia o ausencia de producto de amplificación puede usarse para determinar si una mutación génica está presente en una muestra dada de ácido nucleico. En algunas realizaciones, los cebadores específicos de alelo pueden diseñarse de modo que la presencia de un producto de amplificación sea indicativa de una mutación génica. En algunas realizaciones, los cebadores específicos de alelo pueden diseñarse de modo que la ausencia de producto de amplificación sea indicativa de una mutación génica.

En algunas realizaciones, se usan dos reacciones complementarias. Una reacción emplea un cebador específico para el alelo de tipo silvestre ("reacción específica de tipo silvestre") y la otra reacción emplea un cebador para el alelo mutante ("reacción específica de mutante"). Las dos reacciones pueden emplear un segundo cebador común. Los cebadores de PCR específicos para un alelo particular (por ejemplo, el alelo de tipo silvestre o el alelo mutante) generalmente coinciden perfectamente con una variante alélica del objetivo, pero no coinciden con otra variante alélica (por ejemplo, el alelo mutante o el alelo de tipo silvestre). La falta de coincidencia puede ubicarse en/cerca del extremo 3' del cebador, lo que conduce a la amplificación preferencial del alelo perfectamente compatible. Si un producto de amplificación puede detectarse a partir de una o en ambas reacciones indica la ausencia o presencia del alelo mutante. La detección de un producto de amplificación solo a partir de la reacción específica de tipo silvestre indica la presencia del alelo de tipo silvestre solamente (por ejemplo, homocigosidad del alelo de tipo silvestre). La detección de un producto de amplificación en la reacción específica de mutante solamente indica la presencia del alelo mutante únicamente (por ejemplo, homocigosidad del alelo mutante). La detección de productos de amplificación de ambas reacciones indica (por ejemplo, un heterocigoto). Como se usa en este documento, este enfoque se denominará "amplificación específica de alelo (ASA)".

La amplificación específica de alelo también puede usarse para detectar duplicaciones, inserciones o inversiones usando un cebador que hibrida parcialmente a través de la unión. La extensión de la superposición de la unión se puede variar para permitir una amplificación específica.

Los productos de amplificación pueden examinarse mediante métodos conocidos en la técnica, que incluyen visualizar (por ejemplo, con uno o más colorantes) bandas de ácidos nucleicos que han migrado (por ejemplo, por electroforesis) a través de un gel para separar los ácidos nucleicos por tamaño.

ii. Extensión de cebador específica de alelo

En algunas realizaciones, se usa un enfoque de extensión de cebador específico de alelo (ASPE) para detectar mutaciones génicas. ASPE emplea cebadores específicos de alelos que pueden distinguir entre alelos (por ejemplo, entre un alelo mutante y un alelo de tipo silvestre) en una reacción de extensión de modo que se obtiene un producto de extensión solo en presencia de un alelo particular (por ejemplo, alelo mutante o alelo de tipo silvestre). Los productos de extensión pueden ser detectables o hacerse detectables, por ejemplo, empleando un desoxinucleótido marcado en la reacción de extensión. Cualquiera de una variedad de marcadores es compatible para su uso en estos métodos, incluyendo, pero sin limitarse a, marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores enzimáticos, etc. En algunas realizaciones, un nucleótido se marca con una entidad que luego puede unirse (directa o indirectamente) mediante un marcador detectable, por ejemplo, una molécula de biotina que puede unirse por colorantes fluorescentes conjugados con estreptavidina. En algunas realizaciones, las reacciones se realizan en multiplex, por ejemplo, usando muchos cebadores específicos de alelo en la misma reacción de extensión.

En algunas realizaciones, los productos de extensión se hibridan con un soporte sólido o semisólido, tal como perlas, matriz, gel, entre otros. Por ejemplo, los productos de extensión pueden marcarse con una secuencia de ácido nucleico particular (por ejemplo, incluida como parte del cebador específico de alelo) y el soporte sólido puede unirse a una "anti-etiqueta" (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico complementaria a la etiqueta en el producto de extensión). Los productos de extensión se pueden capturar y detectar en el soporte sólido. Por ejemplo, las perlas se pueden clasificar y detectar. Uno de esos sistemas que se puede emplear de esta manera es el sistema LUMINEX^{MR} MAP, que puede ser adaptado para la detección de mutaciones de fibrosis quística por TM Bioscience y se vende comercialmente como un arreglo universal de perlas (TAG-IT^{MR}). Se describen métodos y reactivos adicionales, por ejemplo, en la publicación de patente de los Estados Unidos No. 2008/0138803 A1.

iii. Extensión del cebador de un solo nucleótido

En algunas realizaciones, se usa un ensayo de extensión del cebador de un solo nucleótido (SNUPE), en el que el cebador está diseñado para extenderse por un solo nucleótido. En algunos de estos métodos, la identidad del nucleótido justo secuencia abajo (por ejemplo, 3') del extremo 3' del cebador es conocida y difiere en el alelo mutante en comparación con el alelo de tipo silvestre. SNUPE se puede realizar usando una reacción de extensión en la que se marca el único tipo particular de desoxinucleótido (por ejemplo, dATP marcado, dCTP marcado, dGTP marcado o dTTP marcado). Por lo tanto, la presencia de un producto de extensión detectable puede usarse como una indicación de la identidad del nucleótido en la posición de interés (por ejemplo, la posición justo secuencia abajo del extremo 3' del cebador) y, por lo tanto, como una indicación de la presencia o ausencia de una mutación en esa posición. SNUPE se puede realizar como se describe en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.888.819; 5.846.710; 6.280.947; 6.482.595; 6.503.718; 6.919.174; Piggee et al., *Journal of Chromatography A* 781 (1997), páginas 367-375; Hoogendoorn et al., *Human Genetics* (1999) 104: 89-93).

En algunas realizaciones, la extensión del cebador se puede combinar con espectrometría de masas para la detección precisa y rápida de la presencia o ausencia de una mutación. Véanse, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.885.775; y 7.501.251. El formato espectrométrico de masas adecuado incluye, entre otros, desorción/ionización láser asistida por matriz, tiempo de vuelo (MALDI-TOF), electroaspersión (ES), IR-MALDI, resonancia de ciclotrón iónico (ICR), transformada de Fourier, y combinaciones de los mismos.

iv. Ensayo de ligadura de oligonucleótidos

En algunas realizaciones, se usa un ensayo de ligadura de oligonucleótidos ("OLA" u "OL"). OLA emplea dos oligonucleótidos que están diseñados para ser capaces de hibridarse con secuencias contiguas de una sola cadena de moléculas objetivo. Típicamente, uno de los oligonucleótidos está biotinilado, y el otro está marcado de forma detectable, por ejemplo, con una fracción fluorescente conjugada con estreptavidina. Si se encuentra la secuencia complementaria precisa en una molécula objetivo, los oligonucleótidos se hibridarán de manera tal que sus extremos se unan y crearán un sustrato de ligadura que puede capturarse y detectarse. Véase, por ejemplo, Nickerson et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 8923-8927; Landegren et al. (1988) *Science* 241: 1077-1080; y la patente de Estados Unidos No. 4.998.617.

v. Enfoque de hibridación

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se analizan por hibridación usando una o más sondas de oligonucleótidos específicas para una región en el gen correspondiente a una o más mutaciones de p53, y en condiciones suficientemente estrictas para no permitir un solo desajuste de nucleótidos. En ciertas realizaciones, las sondas de ácido nucleico adecuadas pueden distinguir entre un gen normal y un gen mutante que contiene una o más mutaciones. Por ejemplo, las sondas de ácido nucleico adecuadas se unen específicamente a un gen normal pero no a un gen mutante. Alternativamente, las sondas de ácido nucleico se unen específicamente a un gen p53 mutante que contiene una o más mutaciones pero no a un gen normal. Las sondas de la presente invención incluyen aquellas que son capaces de hibridar específicamente un alelo p53 mutante que contiene una o más mutaciones. Las sondas de la presente invención también incluyen aquellas que son capaces de hibridar específicamente un alelo normal en una

región particular del gen p53 y, por lo tanto, son capaces de distinguir un alelo normal de un alelo p53 mutante. Por lo tanto, por ejemplo, un experto habitual en la técnica podría usar sondas de la invención para determinar si un individuo es homocigoto o heterocigoto para un alelo particular.

5 Las técnicas de hibridación de ácido nucleico son bien conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. Los expertos en la técnica entienden cómo estimar y ajustar la rigurosidad de las condiciones de hibridación de modo que las secuencias que tienen al menos un nivel deseado de complementariedad hibridarán de manera estable, mientras que las que tienen una complementariedad inferior no lo harán. Para ejemplos de condiciones y parámetros de hibridación, véase, por ejemplo, Sambrook, et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.; Ausubel, F. M. et al. 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Secaucus, N.J.

15 Las sondas de ácido nucleico pueden comprender ácidos ribonucleicos y/o ácidos desoxirribonucleicos. En algunas realizaciones, las sondas de ácido nucleico son oligonucleótidos (es decir, "sondas de oligonucleótidos"). En general, las sondas de oligonucleótidos son lo suficientemente largas como para unirse específicamente a una región homóloga del gen, pero lo suficientemente cortas como para que una diferencia de un nucleótido entre la sonda y la muestra de ácido nucleico que se analiza interrumpa la hibridación. Típicamente, los tamaños de las sondas de oligonucleótidos varían de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos. En algunas realizaciones, las sondas de oligonucleótidos varían de 15 a 90, 15 a 80, 15 a 70, 15 a 60, 15 a 50, 15 a 40, 15 a 35, 15 a 30, 18 a 30 o 18 a 26 nucleótidos de longitud. Como aprecian los expertos en la técnica, la longitud óptima de una sonda de oligonucleótidos puede depender de los métodos y/o condiciones particulares en los que se puede emplear la sonda de oligonucleótidos.

25 En algunas realizaciones, las sondas de ácido nucleico son útiles como cebadores, por ejemplo, para reacciones de amplificación y/o extensión de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las sondas de ácido nucleico se marcan con una fracción detectable como se describe en el presente documento.

Métodos terapéuticos

30 Otro aspecto de la divulgación hace uso de agentes terapéuticos, por ejemplo, inhibidores del PDGFRb, para inhibir o reducir la actividad y/o los niveles de PDGFRb. Por ejemplo, al evitar la transcripción, reprimir los niveles de transcripción de ARNm, inhibir la traducción o interferir directa o indirectamente con la actividad de PDGFRb, es posible tratar y/o inhibir células tumorales, por ejemplo, células tumorales que tienen y/o expresan un gen p53 mutante y/o que tiene un mayor nivel de actividad y/o expresión de PDGFRb en relación con el control. La expresión o actividad de PDGFRb puede modularse directamente a través de la interacción con un gen de PDGFRb, ARNm o la proteína misma, o indirectamente a través de uno o más reguladores secuencia arriba u objetivos secuencia abajo de PDGFRb. Se puede usar cualquier inhibidor de un PDGFRb en los métodos de la divulgación, incluyendo ácido nucleico, polipéptido e inhibidores de molécula pequeña. Se conocen varios inhibidores de PDGFR y/o están disponibles comercialmente. Por ejemplo, los inhibidores de PDGFR útiles en conexión con los métodos descritos en este documento incluyen, entre otros, imatinib, sunitinib, axitinib, BIBF1120 (Vargatef), pazopanib, ponatinib, MK-2461, dovitinib, crenolanib, PP-121, telatinib, CP 673451, TSU-68, Ki8751, tivozanib, masitinib, motesanib, regorafenib y MEDI-575. A continuación se describen agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, inhibidores de PDGFRb.

Anticuerpos

45 La presente descripción abarca el uso de anticuerpos en el tratamiento de cánceres mediados por p53 mutante, por ejemplo, cáncer pancreático. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales; anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos; anticuerpos modificados tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos reformados, anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos (por ejemplo, Fv, Fab', Fab, F(ab')₂); o anticuerpos biosintéticos, por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único (DAB), Fv o Fv de cadena sencilla (scFv). Los métodos para fabricar y usar anticuerpos policlonales y monoclonales son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, en Harlow et al., *Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol I*. Cold Spring Harbor Laboratory (1 de diciembre de 1998). Los métodos para fabricar anticuerpos modificados y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos reformados, anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos, por ejemplo, fragmentos Fab', Fab, F(ab')₂); o anticuerpos biosintéticos (por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único (DAB), Fv, Fv de cadena sencilla (scFv) y similares), son conocidos en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en Zola, *Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives*, Springer Verlag (15 de diciembre de 2000; 1ª edición).

60 Aptámeros

Los aptámeros son macromoléculas compuestas de ácido nucleico (por ejemplo, ARN, ADN) que se unen estrechamente a un objetivo molecular específico (por ejemplo, polipéptido PDGFRb o un epítipo del mismo). Un aptámero particular puede describirse mediante una secuencia de nucleótidos lineal y típicamente tiene una longitud de aproximadamente 15-60 nucleótidos. En algunas realizaciones, los aptámeros se modifican para reducir

drásticamente su sensibilidad a la degradación por enzimas en sangre para su uso en aplicaciones *in vivo*. Además, los aptámeros pueden modificarse para alterar su biodistribución o el tiempo de residencia en plasma.

La selección de aptámeros que pueden unirse a PDGFRb o un fragmento del mismo se puede lograr a través de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los aptámeros pueden seleccionarse utilizando el método SELEX (Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) (Tuerk, C. y Gold, L., *Science* 249: 505-510 (1990); Jayasena, *SD Clin. Chem.* 45 : 1628-1650 (1999)).

Antisentido y ribozimas

Otros agentes que son útiles en los métodos descritos en este documento son los ácidos nucleicos, que incluyen moléculas antisentido o moléculas de ácido nucleico catalítico (por ejemplo, ribozimas) que hibridan específicamente ARNm que codifica un polipéptido objetivo. Una construcción antisentido incluye el complemento inverso de al menos parte de la secuencia de codificación de ADNc o ARNm de un polipéptido objetivo, el ADNc del polipéptido objetivo o la secuencia génica o regiones flanqueantes de los mismos, y por lo tanto puede hibridarse con el ARNm.

La secuencia introducida no necesita ser ADNc de longitud completa o el gen o complemento inverso del mismo, y no necesita ser exactamente homóloga a la secuencia equivalente encontrada en el tipo de célula a transformar. Las moléculas antisentido se pueden hacer usando técnicas conocidas en el arte (véase, por ejemplo, Agrawal, *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 1993, Vol. 20 ("Protocols for Oligonucleotides and Analogs")).

La molécula antisentido puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de entrecruzamiento activado por hibridación, un agente de transporte, un aptámero o un agente de escisión activado por hibridación. También se puede incluir una fracción de direccionamiento que aumenta la absorción de la molécula por las células. La fracción de direccionamiento puede ser una molécula de unión específica, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce una molécula presente en la superficie de la célula.

Como alternativa, el agente es un ácido nucleico catalítico, tal como una ribozima (una molécula de ARN sintético que posee actividad endorribonucleasa altamente específica). La producción y el uso de ribozimas se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 4.987.071 y 5.543.508. Las ribozimas pueden sintetizarse y administrarse a una célula o un sujeto, o pueden codificarse en un vector de expresión, a partir del cual la ribozima se sintetiza en la célula objetivo (véase, por ejemplo, el documento WO 9523225, y Beigelman et al., *Nucl. Acids Res* 23: 4434-42, 1995). Los ejemplos de oligonucleótidos con actividad catalítica se describen, por ejemplo, en los documentos WO 9506764 y WO 9011364, y Sarver et al., *Science* 247: 1222-1225, 1990. La inclusión de secuencias de ribozimas dentro de los ARN antisentido puede usarse para conferir actividad de escisión del ARN en el ARN antisentido, de modo que las moléculas de ARNm endógeno que se unen al ARN antisentido se escinden, lo que, a su vez, conduce a una inhibición antisentido mejorada de la expresión génica endógena .

ARN de interferencia

Las moléculas de ácido nucleico bicatenario que pueden silenciar un gen que codifica un polipéptido objetivo también se pueden usar como agentes en los métodos descritos en este documento. El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional en el que el ARN bicatenario (ARNbc) correspondiente a un gen (o región de codificación) de interés se introduce en una célula o un organismo, lo que resulta en la degradación del ARNm correspondiente . El efecto del ARNi persiste durante múltiples divisiones celulares antes de que se recupere la expresión génica. El ARNi es, por lo tanto, un método eficaz para realizar "inactivación dirigida" o "expresión reducida" a nivel del ARN. El ARNi ha demostrado ser exitoso en células humanas, incluidas las células de riñón embrionario humano y HeLa (véase, por ejemplo, Elbashir et al., *Nature* 411: 494-498, 2001). Por ejemplo, el silenciamiento génico puede ser inducido en células de mamíferos por la expresión endógena de horquillas de ARN (véase Paddison et al., *PNAS (USA)* 99: 1443-1448, 2002). En otros casos, la transfección de ARNbc pequeño (21-23 nt) inhibe específicamente la expresión génica (revisado en Caplen, *Trends Biotechnol.* 20: 49-51, 2002).

En resumen, se cree que el ARNi funciona de la siguiente manera. Se introduce en una célula miARN, pre-miARN, pri-miARN o ARNbc correspondiente a una porción de un gen que se va a silenciar. El ARNbc se digiere en ARNpi de 21-23 nucleótidos, o ARN interferente cortos. Los dúplex de ARNpi se unen a un complejo de nucleasa para formar lo que se conoce como el complejo de silenciamiento inducido por ARN, o RISC. RISC se dirige a la transcripción homóloga mediante interacciones de emparejamiento de bases entre una de las cadenas de ARNpi y el ARNm endógeno. Luego escinde el ARNm aproximadamente 12 nucleótidos desde el terminal 3' del ARNpi (revisado en Sharp et al., *Genes Dev.* 15: 485-490, 2001; y Hammond et al., *Nature Rev. Gen.* 2: 110- 119, 2001).

La tecnología de ARNi en el silenciamiento génico utiliza métodos estándar de biología molecular. El ARNbc correspondiente a la secuencia de un gen objetivo que va a ser inactivado puede producirse mediante métodos estándar, por ejemplo, por transcripción simultánea de ambas cadenas de un ADN plantilla (correspondiente a la secuencia objetivo) con ARN polimerasa T7. Los kits para la producción de ARNbc para uso en ARNi están disponibles comercialmente, por ejemplo, a través de New England Biolabs, Inc. Los métodos de transfección de ARNbc o plásmidos diseñados para elaborar ARNbc son rutinarios en la técnica.

Se han informado efectos de silenciamiento génico similares a los de ARNi en células de mamífero con transfección de un constructo híbrido de ARNm-ADNc (Lin et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281: 639-644, 2001), y puede usarse como otro método para silenciar genes. Las aplicaciones terapéuticas de ARNi se describen, por ejemplo, en Shuey, *Drug Discov. Today* 7: 1040-1046, 2002.

Además, ARNpi también puede administrarse mediante un enfoque de terapia génica, por ejemplo, usando un vector de ADN a partir del cual los compuestos de ARNpi en, por ejemplo, forma de horquilla pequeña (ARNhp), pueden transcribirse directamente. Numerosos estudios han demostrado que si bien los ARNpi de doble cadena son muy efectivos para mediar ARNi, los ARN cortos, monocatenarios y en forma de horquilla también pueden mediar ARNi, presumiblemente porque se pliegan en dúplex intramoleculares que se procesan en ARNpi de doble cadena mediante enzimas celulares (véase, por ejemplo, Sui et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 5515-5520 (2002); Yu et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 6047-6052 (2002); Paul et al., *Nature Biotech.*, 20: 505-508 (2002); Hannon, *Nature*. 418: 244-251 (2002); Shi, *Trends Genet*, 19: 9-12 (2003); véase también Xia et al., *Nature Biotech.*, 20: 1006-1010 (2002)).

Moléculas pequeñas

Los moduladores de moléculas pequeñas (por ejemplo, inhibidores o activadores) de la expresión génica también están dentro del alcance de la invención y pueden detectarse mediante el cribado de bibliotecas de compuestos usando, por ejemplo, líneas celulares que expresan un polipéptido PDGFRb o una versión de un polipéptido PDGFRb que se ha modificado para incluir una fracción fácilmente detectable. Los métodos para identificar compuestos capaces de modular la expresión génica se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 5.976.793.

Administración Terapéutica

La ruta y/o modo de administración de un agente terapéutico descrito en el presente documento puede variar dependiendo de los resultados deseados. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada, por ejemplo, una respuesta terapéutica.

Los métodos de administración incluyen, pero no se limitan a, intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, intravenoso, subcutáneo, intranasal, epidural, oral, sublingual, intracerebral, intravaginal, transdérmico, rectal, por inhalación o tópico, particularmente a los oídos, nariz, ojos o piel. El modo de administración se deja a discreción del profesional.

En algunos casos, un agente terapéutico descrito en este documento se administra localmente. Esto se logra, por ejemplo, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica (por ejemplo, en una crema o loción), mediante inyección, por medio de un catéter, mediante un supositorio o enema, o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluidas las membranas, tales como las membranas sialísticas o fibras. En algunas situaciones, un agente terapéutico descrito en este documento se introduce en el sistema nervioso central, el sistema circulatorio o el tracto gastrointestinal por cualquier vía adecuada, incluida la inyección intraventricular, intratecal, inyección paraespinal, inyección epidural, enema y mediante inyección adyacente al nervio periférico. La inyección intraventricular se puede facilitar mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya.

Esta divulgación también presenta un dispositivo para administrar un agente terapéutico descrito en el presente documento. El dispositivo puede incluir, por ejemplo, uno o más alojamientos para almacenar composiciones farmacéuticas, y puede configurarse para administrar dosis unitarias de un agente terapéutico descrito en el presente documento.

La administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante, o mediante perfusión en un fluorocarbono o tensioactivo pulmonar sintético.

En algunos casos, un agente terapéutico descrito en este documento puede administrarse en una vesícula, en particular, un liposoma (véase Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990) y Treat et al., *Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer*, páginas 317-327 y páginas 353-365 (1989)).

En otras situaciones, un agente terapéutico descrito en este documento puede administrarse en un sistema de liberación controlada o un sistema de liberación sostenida (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, 2: 115-138 (1984)). Se pueden usar otros sistemas de liberación controlada o sostenida discutidos en la revisión de Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990). En un caso, se puede usar una bomba (Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990); Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88: 507 (1980) y Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321: 574 (1989)). En otras situaciones, se puede colocar un sistema de liberación controlada o sostenida cerca de un objetivo de un agente terapéutico descrito en este documento, reduciendo la dosis a una fracción de la dosis sistémica.

Un agente terapéutico descrito en el presente documento puede formularse como una composición farmacéutica que incluye una cantidad adecuada de un excipiente fisiológicamente aceptable (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, páginas. 1447-1676 (Alfonso R. Gennaro, ed., 19ª edición 1995)). Tales excipientes fisiológicamente aceptables pueden ser, por ejemplo, líquidos, tales como agua y aceites, incluidos los de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los excipientes fisiológicamente aceptables pueden ser solución salina, goma de acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. En una situación, los excipientes fisiológicamente aceptables son estériles cuando se administran a un animal. El excipiente fisiológicamente aceptable debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de los microorganismos. El agua es un excipiente particularmente útil cuando una nanopartícula descrita en el presente documento se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como excipientes líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes fisiológicamente aceptables adecuados también incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Otros ejemplos de excipientes fisiológicamente aceptables adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences páginas 1447-1676 (Alfonso R. Gennaro, ed., 19 ed. 1995). Las composiciones farmacéuticas, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores del pH.

Los portadores líquidos pueden usarse en la preparación de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires. Un agente terapéutico descrito en este documento puede suspenderse en un portador líquido farmacéuticamente aceptable tal como agua, un disolvente orgánico, una mezcla de ambos, o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. El portador líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados que incluyen solubilizantes, emulsionantes, tampones, conservantes, edulcorantes, agentes saborizantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, colorantes, reguladores de viscosidad, estabilizadores u osmorreguladores. Los ejemplos adecuados de portadores líquidos para administración oral y parenteral incluyen agua (en particular, que contienen los aditivos descritos en este documento, por ejemplo, derivados de celulosa, incluida la solución de carboximetilcelulosa de sodio), alcoholes (incluidos alcoholes monohídricos y los alcoholes polihídricos, por ejemplo, glicoles) y sus derivados y aceites (por ejemplo, aceite de coco fraccionado y aceite de cacahuate). Para la administración parenteral, el portador también puede ser un éster aceitoso tal como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los portadores líquidos pueden estar en forma líquida estéril para la administración. El portador líquido para composiciones presurizadas puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propelente farmacéuticamente aceptable.

En otros casos, un agente terapéutico descrito en el presente documento se formula para administración intravenosa. Las composiciones para administración intravenosa pueden comprender un tampón acuoso isotónico estéril. Las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para administración intravenosa pueden incluir opcionalmente un anestésico local como la lignocaina para disminuir el dolor en el sitio de la inyección. Los ingredientes se pueden suministrar por separado o mezclados en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado, tal como una ampolla o una bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando un agente terapéutico descrito en el presente documento se administra por infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando un agente terapéutico descrito en el presente documento se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En otras circunstancias, un agente terapéutico descrito en este documento puede administrarse a través de la superficie del cuerpo y los revestimientos internos de los conductos corporales, incluidos los tejidos epiteliales y mucosos. Dichas administraciones pueden llevarse a cabo usando un agente terapéutico descrito en este documento en lociones, cremas, espumas, parches, suspensiones, soluciones y supositorios (por ejemplo, rectal o vaginal). En algunos casos, se puede usar un parche transdérmico que contiene un agente terapéutico descrito en este documento y un portador que es inerte para el agente terapéutico descrito en este documento, no es tóxico para la piel y permite la administración del agente para la absorción sistémica en el torrente sanguíneo a través de la piel. El portador puede tomar cualquier cantidad de formas, como cremas o ungüentos, pastas, geles o dispositivos oclusivos. Las cremas o pomadas pueden ser emulsiones líquidas viscosas o semisólidas del tipo aceite en agua o agua en aceite. También se pueden usar pastas de polvos absorbentes dispersos en petróleo o petróleo hidrófilo que contienen un agente terapéutico descrito en este documento. Se puede usar una variedad de dispositivos oclusivos para liberar un agente terapéutico descrito en el presente documento en el torrente sanguíneo, tal como una membrana semipermeable que cubre un depósito que contiene el agente terapéutico descrito en el presente documento con o sin un portador, o una matriz que contiene el agente terapéutico descrito en el presente documento.

Un agente terapéutico descrito en el presente documento puede administrarse por vía rectal o vaginal en forma de un supositorio convencional. Las formulaciones de supositorios se pueden hacer utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica a partir de materiales tradicionales, incluida la manteca de cacao, con o sin la adición de ceras para alterar el punto de fusión del supositorio, y glicerina. También se pueden usar bases de supositorios solubles en agua, tales como polietilenglicoles de diversos pesos moleculares.

La cantidad de un agente terapéutico descrito en el presente documento que es eficaz para tratar un trastorno o enfermedad se determina usando técnicas clínicas estándar conocidas por los expertos en la técnica. Además, los ensayos *in vitro* o *in vivo* pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear también puede depender de la vía de administración, la afección, la gravedad de la afección que se está tratando, así como varios factores físicos relacionados con el individuo que se está tratando, y se puede decidir de acuerdo con el criterio de un profesional de la salud. Por ejemplo, la dosis de un agente terapéutico descrito en el presente documento puede variar de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal por día, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal por día, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal por día, o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día. Las dosis equivalentes se pueden administrar durante varios períodos de tiempo que incluyen, entre otros, aproximadamente cada 2 h, aproximadamente cada 6 h, aproximadamente cada 8 h, aproximadamente cada 12 h, aproximadamente cada 24 h, aproximadamente cada 36 h, aproximadamente cada 48 h, aproximadamente cada 72 horas, aproximadamente cada semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas, aproximadamente cada mes y aproximadamente cada 2 meses. El número y la frecuencia de las dosis correspondientes a un curso completo de terapia se pueden determinar de acuerdo con el criterio de un profesional de la salud.

En algunos casos, una composición farmacéutica descrita en el presente documento está en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como una tableta, cápsula, polvo, solución, suspensión, emulsión, gránulo o supositorio. En tal forma, la composición farmacéutica puede subdividirse en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas de un agente terapéutico descrito en este documento. La forma de dosificación unitaria puede ser una composición farmacéutica envasada, por ejemplo, polvos envasados, viales, ampollas, jeringas precargadas o sobres que contienen líquidos. La forma de dosificación unitaria puede ser, por ejemplo, una cápsula o tableta, o puede ser el número apropiado de cualquiera de tales composiciones en forma envasada. Dicha forma de dosificación unitaria puede contener de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, y puede administrarse en una dosis única o en dos o más dosis divididas.

Kits

Otro aspecto de la divulgación proporciona un kit para analizar la presencia de un p53 mutante, por ejemplo, en una muestra de tumor. El kit puede comprender, por ejemplo, un anticuerpo para la detección de un polipéptido o una sonda para la detección de un polinucleótido. Además, el kit puede incluir una muestra de referencia o control, instrucciones para procesar muestras, realizar la prueba e interpretar los resultados, tampones y otros reactivos necesarios para realizar la prueba. En una realización, el kit comprende uno o más inhibidores de PDGFRb descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, el kit incluye instrucciones para administrar uno o más inhibidores de PDGFRb si se detecta un p53 mutante en la muestra de tumor.

Cánceres

La divulgación incluye métodos de tratamiento para diversos tipos de cáncer, incluidos, entre otros, tumores sólidos y tumores nacidos en sangre. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de tejidos de la piel, órganos, huesos, cartílagos, sangre y vasos. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de cabeza, cuello, ojos, boca, garganta, esófago, tórax, hueso, pulmón, colon, recto, estómago, próstata, mama, ovarios, riñón, hígado, páncreas y cerebro. En algunas realizaciones, un cáncer abarca cánceres primarios y/o metastásicos.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se usan para tratar y/o prevenir el cáncer de páncreas, por ejemplo, tratar y/o prevenir la metástasis de un tumor pancreático, por ejemplo, un tumor pancreático que tiene o expresa un gen p53 mutante. En algunas realizaciones, el cáncer de páncreas es cáncer de páncreas exocrino o cáncer de páncreas endocrino. El cáncer de páncreas exocrino incluye, entre otros, adenocarcinomas, carcinomas de células acinares, carcinomas adenoescamosos, carcinomas coloidales, carcinomas indiferenciados con células gigantes similares a osteoclastos, carcinomas hepatoides, neoplasias papilares-mucinosas intraductales, neoplasmas quísticos mucinosos, pancreatoblastomas, cistadenomas serosos carcinomas de células anulares de sello, tumores sólidos y pseudopapilares, carcinomas ductales pancreáticos y carcinomas indiferenciados. En algunas realizaciones, el cáncer pancreático exocrino es el carcinoma ductal pancreático. El cáncer de páncreas endocrino incluye, entre otros, insulinomas y glucagonomas.

En algunas realizaciones, el cáncer de páncreas es cáncer de páncreas en etapa temprana, cáncer de páncreas no metastásico, cáncer de páncreas primario, cáncer de páncreas avanzado, cáncer de páncreas localmente avanzado, cáncer de páncreas metastásico, cáncer de páncreas irreseccable, cáncer de páncreas en remisión o cáncer de páncreas recurrente. En algunas realizaciones, el cáncer de páncreas es resistente a una o más terapias conocidas. En algunas realizaciones, el cáncer de páncreas es reseccable (es decir, tumores que están confinados a una porción del páncreas o se ha diseminado más allá de él que permite la extirpación quirúrgica completa), o localmente avanzado (irseccable) (es decir, los tumores localizados pueden ser irreseccables debido a vulneración local del vaso o invasión por un tumor). En algunas realizaciones, el cáncer de páncreas es, de acuerdo con las clasificaciones TNM del Comité Estadounidense Conjunto sobre el Cáncer (AJCC), un tumor en etapa 0 (el tumor está confinado a las capas superiores

de las células del conducto pancreático y no ha invadido tejidos más profundos, y no se ha propagado fuera del páncreas (por ejemplo, carcinoma pancreático *in situ* o neoplasia intraepitelial pancreática III), un tumor en estadio IA (el tumor está confinado al páncreas y tiene menos de 2 cm de tamaño, y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos o sitios distintos), un tumor en estadio IB (el tumor está confinado al páncreas y mide más de 2 cm, y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos ni a sitios distantes), un tumor en estadio IIA (el tumor está creciendo fuera del páncreas pero no en vasos sanguíneos grandes, y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos ni a sitios distantes), un tumor en estadio IIB (el tumor está confinado al páncreas o crece fuera del páncreas pero no a los vasos sanguíneos grandes o nervios principales cercanos, y se ha propagado a ganglios linfáticos cercanos pero no a sitios distantes), un tumor en estadio III (el tumor está creciendo fuera del páncreas hacia vasos sanguíneos grandes cercanos o nervios principales, y puede haberse diseminado o no a los ganglios linfáticos cercanos) o un tumor en estadio IV (el cáncer se ha diseminado a sitios distantes).

Los métodos proporcionados en el presente documento pueden usarse para tratar a un sujeto que ha sido diagnosticado con cáncer de páncreas y ha sido tratado con una terapia previa (por ejemplo, terapia basada en gemcitabina, erlotinib o 5-fluorouracilo). En algunas realizaciones, un sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, un sujeto humano tiene al menos aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 u 85 años. En algunas realizaciones, un sujeto tiene antecedentes familiares de cáncer de páncreas (por ejemplo, al menos 2 familiares de primer grado afectados con cáncer de páncreas sin acumulación de otros cánceres o enfermedades familiares). En algunas realizaciones, un sujeto tiene uno o más síndromes de cáncer de páncreas hereditario, que incluyen, pero no se limitan a, mutación BRCA2, melanoma atípico familiar de múltiples lunares (FAMMM), síndrome de Peutz-Jeghers y pancreatitis hereditaria. En algunas realizaciones, un sujeto es fumador desde hace mucho tiempo (por ejemplo, más de 10, 15 o 20 años). En algunas realizaciones, un sujeto tiene un puntaje ECOG/WHO/Zubrod de 0 (asintomático), 1 (sintomático pero completamente ambulatorio), 2 (sintomático, <50% en cama durante el día), 3 (sintomático, >50% en cama, pero no postrado), o 4 (postrado). En algunas realizaciones, un sujeto tiene una sola lesión en la presentación. En algunas realizaciones, un sujeto tiene múltiples lesiones en la presentación. En algunas realizaciones, un sujeto es un ser humano que exhibe uno o más síntomas asociados con el cáncer de páncreas.

Los métodos descritos en el presente documento son útiles para diversos aspectos del tratamiento del cáncer de páncreas. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para inhibir la proliferación de células de cáncer de páncreas (tal como el crecimiento tumoral de cáncer de páncreas) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de PDGFRb descrito en este documento. En algunas realizaciones, se inhibe al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% la proliferación celular.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para inhibir la metástasis tumoral, por ejemplo, metástasis tumoral de cáncer de páncreas, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de PDGFRb descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, se inhibe al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de la metástasis. En algunas realizaciones, se proporciona un método para inhibir la metástasis a uno o más ganglios linfáticos.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para reducir (tal como erradicar) metástasis tumorales preexistentes, por ejemplo, metástasis tumoral de cáncer de páncreas (tal como metástasis al ganglio linfático) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un inhibidor de PDGFRb descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la metástasis se reduce al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para reducir el tamaño del tumor, por ejemplo, el tamaño del tumor de cáncer de páncreas, en un sujeto, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un inhibidor de PDGFRb descrito en este documento. En algunas realizaciones, el tamaño del tumor se reduce al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En algunas realizaciones, el sujeto tiene cáncer de páncreas no metastásico. En algunas realizaciones, el sujeto tiene cáncer de páncreas primario.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para prolongar el tiempo hasta la progresión de la enfermedad del cáncer, por ejemplo, cáncer de páncreas (por ejemplo, supervivencia libre de progresión) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de PDGFRb descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la administración de un inhibidor de PDGFRb prolonga el tiempo hasta la progresión de la enfermedad en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 semanas. En algunas realizaciones, la administración de un inhibidor de PDGFRb prolonga el tiempo de progresión de la enfermedad en al menos 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3.0, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 4.0, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0, 8.2, 8.4, 8.6, 8.8, 9.0, 9.2, 9.4, 9.6, 9.8, 10.0, 10.2, 10.4, 10.6, 10.8, 11.0, 11.2, 11.4, 11.6, 11.8, 12.0, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 o 72 meses.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para prolongar la supervivencia global de un sujeto que tiene cáncer, por ejemplo, cáncer de páncreas, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de PDGFRb descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la administración de un inhibidor de PDGFRb prolonga la supervivencia del sujeto al menos 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3.0, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 4.0, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0, 8.2, 8.4, 8.6, 8.8, 9.0,

9.2, 9.4, 9.6, 9.8, 10.0, 10.2, 10.4, 10.6, 10.8, 11.0, 11.2, 11.4, 11.6, 11.8, 12.0, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 o 72 meses.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para interrumpir (tal como destruir) el estroma del cáncer de páncreas de un sujeto que tiene cáncer de páncreas, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de PDGFRb descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el estroma del cáncer de páncreas se altera o destruye al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En algunas realizaciones, el sujeto tiene cáncer de páncreas no metastásico. En algunas realizaciones, el sujeto tiene cáncer de páncreas primario.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para mejorar uno o más beneficios clínicos de un sujeto que tiene cáncer, por ejemplo, cáncer de páncreas, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de PDGFRb descrito en este documento. Los beneficios clínicos incluyen, pero no se limitan a, mayor/mejor calidad de vida, mayor/mejor control de los síntomas del cáncer, por ejemplo, cáncer de páncreas y aumento de peso.

Terapia de combinación

En algunas realizaciones, un inhibidor de PDGFRb descrito en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con una o más terapias adicionales, por ejemplo, para tratar un tumor y/o uno o más síntomas de un tumor. Por ejemplo, un inhibidor de PDGFRb se puede administrar en combinación con uno o más ingredientes o fármacos anticancerígenos adicionales. Dichos ingredientes anticancerígenos incluyen terapias anticancerígenas conocidas que incluyen, pero no se limitan a, un antifolato, una 5-fluoropirimidina (incluido 5-fluorouracilo), un análogo de citidina tal como β -L-1,3-dioxolanil citidina o β -L-1,3-dioxolanil 5-fluorocitidina, un antimetabolito (incluidos los antimetabolitos de purina, citarabina, fudarabina, floxuridina, 6-mercaptopurina, metotrexato y 6-tioguanina), hidroxiaurea, un inhibidor mitótico (incluido CPT-11, Etopósido (VP-21), alcaloides de taxol y de la vinca como vincristina y vinblastina), un agente alquilante (que incluye, entre otros, busulfano, clorambucilo, ciclofosfamida, ifofamida, mecloretamina, melfalan y tiotepa), un agente alquilante no clásico, un compuesto que contiene platino, bleomicina, un antibiótico antitumoral, una antraciclina como la doxorubicina y la daunomicina, una antracenodiona, un inhibidor de la topoisomerasa II, un agente hormonal (que incluye, entre otros, un corticosteroide (dexametasona, prednisona y metilprednisona), un andrógeno como fluoximesterona y metiltestosterona), un estrógeno como dietilestilbesterol, un antiestrógeno como tamoxifeno, un análogo de LHRH tal como leuprolida, un antiandrógeno tal como flutamida, aminoglutetimida, acetato de megestrol y medroxiprogesterona, asparaginasa, carmustina, lomustina, hexametil-melamina, dacarbazina, mitotano, estreptozocina, cisplatino, carboplatino, levamisol y leucovorina. Los compuestos de la presente invención también se pueden usar en combinación con un agente de terapia enzimática y/o modulador del sistema inmune tal como un interferón, interleucina, factor de necrosis tumoral, factor estimulante de colonias de macrófagos y factor estimulante de colonias. En algunas realizaciones, se administra un inhibidor de PDGFRb en combinación con uno o más de gemcitabina (por ejemplo, GEMZAR®), erlotinib (por ejemplo, TARCEVA®), gefitinib, un taxano (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel), capecitabina, mitomicina y/o irinotecano.

En algunas realizaciones, la administración combinada de un inhibidor de PDGFRb y un segundo agente da como resultado una mejora en una enfermedad o trastorno descrito en el presente documento o un síntoma del mismo en un grado que es mayor que uno producido por el inhibidor de PDGFRb o el segundo agente solo. La diferencia entre el efecto combinado y el efecto de cada agente solo puede ser una diferencia estadísticamente significativa.

En algunas realizaciones, la administración combinada de un inhibidor de PDGFRb y un segundo agente permite la administración del segundo agente a una dosis reducida, a un número reducido de dosis y/o a una frecuencia de dosificación reducida en comparación con un régimen de dosificación estándar aprobado para el segundo agente.

Identificación de moduladores de la expresión o actividad de PDGFRb

El PDGFRb descrito en el presente documento es útil para identificar agentes que pueden usarse potencialmente para tratar un trastorno descrito en el presente documento, por ejemplo, un cáncer. Por ejemplo, un agente que disminuye la expresión o actividad de un PDGFRb puede identificarse como un agente que puede usarse para tratar el cáncer. Existen numerosos métodos para evaluar si un agente altera una actividad o nivel de expresión del polipéptido PDGFRb. En una realización, la capacidad de un agente de prueba para modular (por ejemplo, aumentar o disminuir) (por ejemplo, permanente o temporalmente) la expresión de un promotor de polinucleótido PDGFRb se evalúa, por ejemplo, mediante un ensayo de transcripción informador de rutina (por ejemplo, LacZ, luciferasa o GFP). Por ejemplo, una célula o animal transgénico cuyo genoma comprende un gen informador unido operativamente a un promotor del polinucleótido PDGFRb, puede ponerse en contacto con un agente de prueba, y la capacidad del agente de prueba para aumentar o disminuir la actividad del informador es indicativa de la capacidad del agente para modular un polipéptido PDGFRb.

En algunas realizaciones, los efectos de un agente de prueba sobre una actividad o nivel de expresión del polipéptido PDGFRb se pueden evaluar en una célula, lisado celular o sujeto, preferiblemente un mamífero experimental no humano, y más preferiblemente un roedor (por ejemplo, un rata, ratón, conejo) o explante del mismo. Los métodos para evaluar la expresión de un polipéptido PDGFRb son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, análisis Northern,

ensayo de protección de ribonucleasa, reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) o hibridación de ARN *in situ* (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* (3rd ed. 2001)). El nivel de un polipéptido PDGFRb puede controlarse mediante, por ejemplo, análisis Western, inmunoensayo o hibridación *in situ*. En algunas realizaciones, un constructo de ADN que codifica un polipéptido PDGFRb/proteína de fusión GFP se transfecta en células, y se determina el nivel de fluorescencia de GFP en presencia o ausencia de un agente de prueba. Una disminución de la fluorescencia en presencia del agente de prueba es indicativa de la capacidad del agente de prueba para disminuir un nivel de polipéptido PDGFRb.

Los agentes y agentes de prueba que se usan en los métodos descritos en el presente documento incluyen extractos crudos o parcial o sustancialmente purificados de fuentes orgánicas, por ejemplo, extractos botánicos (por ejemplo, herbales) y de algas, elementos o compuestos inorgánicos, así como agentes parcial o sustancialmente purificados o sintéticos, por ejemplo, moléculas pequeñas, polipéptidos, anticuerpos y polinucleótidos y bibliotecas de los mismos.

En un ejemplo, se pueden producir u obtener bibliotecas químicas combinatorias que muestren compuestos químicos que están relacionados o no relacionados estructural o químicamente. La preparación y selección de bibliotecas químicas combinatorias es bien conocida por los expertos en la técnica. Dichas bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de péptidos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.010.175; Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37: 487-493 (1991) y Houghton et al. al., *Nature* 354: 84-88 (1991)). También se pueden usar otros procesos químicos para generar bibliotecas de diversidad química. Dichos procesos químicos incluyen, pero no se limitan a: peptoides (por ejemplo, publicación PCT No. WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, publicación PCT No. WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (por ejemplo, publicación PCT No. WO 92/00091), benzodiazepinas (por ejemplo, patente de los Estados Unidos No. 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílicos (Hagihara et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568 (1992)), peptidomiméticos no péptidos con andamiaje de glucosa (Hirschmann et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217-9218 (1992)), síntesis orgánica análoga de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho et al., *Science* 261: 1303 (1993)), y/o peptidilfosfonatos (Campbell et al., *J. Org. Chem.* 59: 658 (1994)), bibliotecas de ácido nucleico, bibliotecas de ácido nucleico peptídico (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn et al., *Nature Biotechnology*, 14 (3): 309-314 (1996) y el documento PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (véase, por ejemplo, Liang et al., *Science*, 274: 1520-1522 (1996) y la patente de Estados Unidos No. 5.593.853) y bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véanse, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum C&EN, 18 de enero, página 33 (1993); isoprenoides, patente de Estados Unidos No. 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, patente de Estados Unidos No. 5.549.974; pirrolidinas, patentes de Estados Unidos Nos 5.525.735 y 5.519.134; compuestos de morfolino, patente de Estados Unidos No. 5.506.337; benzodiazepinas, patente de Estados Unidos No. 5.288.514 y similares).

Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen en este documento.

La divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos. No deben interpretarse como limitantes del alcance o contenido de la divulgación de ninguna manera.

Ejemplos

En los ejemplos descritos en el presente documento, se combinaron varios enfoques y modelos ortogonales para explorar sistemáticamente la base molecular mediante la cual el p53 mutante promueve la invasión y metástasis en PDAC y las implicaciones clínicas de sus efectos. Estos estudios identificaron el receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRb) como necesario y suficiente para mediar los efectos del p53 mutante en la invasión y metástasis tanto en un modelo murino como en células PDAC humanas. Además, la expresión elevada de PDGFRb se identificó como un indicador de supervivencia pobre libre de metástasis en pacientes humanos con PDAC. En conjunto, estos datos identifican un mediador clave de la actividad de p53 mutante e indican que los inhibidores de PDGFRb pueden actuar como agentes antimetastásicos en pacientes con tumores que expresan p53 mutante.

Métodos y materiales

Constructos retrovirales, anticuerpos y reactivos

Todos los vectores se derivaron de la cadena principal del vector retroviral del virus de células madre murinas (MSCV, Clontech). El ADNc de PDGFRb (Addgene, # 23893) se subclonó en MSCV-PGK-Puro-IRES-GFP (MSCV-PIG) (Hemann et al., 2003). Los ARNph basados en miR30 se diseñaron y clonaron como se describió anteriormente (Zuber et al., 2011), y las secuencias se proporcionan a continuación:

Gen objetivo	nombre	organismo	secuencia
p53	1224	ratón	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCACTACAAGTACATGTGTAAATAGTGAAGCCACACAGATGTATTACACATGTACTTTGTAGTGGATGCCTACTGCCTCGGA
p53	703	ratón	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCGGGTGAAGGAAATTTGTATAGTGAAGCCACACAGATGTATACAAAATTTCCCTTCCACCCGGATGCCTACTGCC
p53	393	ratón	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCTGTCACTTTTGTCCCTTAGTGAAGCCACACAGATGTAAAGGGACAAAAGATGACAGGGGGTGCCTACTGCC
p53	996	humano	Tgctgttacacagtgagcgccctggaagactccacagtgtaattagtaagccacagatgtaattaccactggagtgctccactgacctcgga
p53	2057	humano	Tgctgttacacagtgagcgaggatttcactctgtattagtaagccacagatgtaatacaagagatgaaatccctccactgacctcgga
Pdgfrb	544	ratón	TGCTGTTGACAGTGAGCGGATGGGCCAGAGTTTGTCTCAATAGTGAAGCCACACAGATGTATTGAGAACAACCTCTGGCCAGTGCCTACTGCC
Pdgfrb	5241	ratón	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCACAATGGTACCAAGATAGTAGTGAAGCCACACAGATGTATCTATCTTTGGTACCATTGTGATGCCTACTGCCTCGGA
Pdgfrb	4778	humano	TGCTGTTGACAGTGAGCGCACGCACTAACATTTAGAGTATAGTGAAGCCACACAGATGTACTCTAGAATGTTAGTGTGGTGCCTACTGCC
Pdgfrb	3204	humano	TGCTGTTGACAGTGAGCGCACAGTTCTACAATGCCATCAAAATAGTGAAGCCACACAGATGTATTTTGATGGCATTGTAGAACTGCTGCCTACTGCCTCGGA
p73	254	ratón	TGCTGTTGACAGTGAGCGACCCACTCTTGAAGAAGTTGTATAGTGAAGCCACACAGATGTATACAACCTTCTCAAGAGTGGGGTGCCTACTGCC
p73	3827	ratón	TGCTGTTGACAGTGAGCGCACAGCTTTGTGCATCCAATTAATAGTGAAGCCACACAGATGTATTAAATTTGGATGCACAAAAGCTGGTGCCTACTGCC
NF-YB	1	ratón	TGCTGTTGACAGTGAGCGGACTAGGGATTTCTGCAGACTAATAGTGAAGCCACACAGATGTATTAGTCTGCAGAAAATCCCTAGCTGCCTACTGCC
NF-YB	2	ratón	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCAGGAGGAAAGCAATATAGTGAAGCCACACAGATGTATTTCCGCTTCTCCTGATGCCTACTGCC
Control	1	-	TGCTGTTGACAGTGAGCGCAGGAATTAATAATGCTTATCTATAGTGAAGCCACACAGATGTATAGATAAGCATTATAAATCCCTATGCCTACTGCCTCGGA
Control	2	-	Tgctgttacacagtgagcgccccctggaagtctctgattaatagtaagccacagatgtattaatcagagacttcaggcggttgacctgacctcgga

Los ARNph se clonaron en el vector MLP (MSCV-mir30-PGK-Puro-IRES-GFP) para la expresión constitutiva, y los ARNph inducibles se clonaron en el vector TRMPV-Neo (pSIN-TRE-dsRed-miR30-PGK-Venus-IRES-NeoR) como se describió anteriormente (Zuber et al., 2011). Todos los constructos fueron verificadas por secuenciación.

5 Se detectó p53 usando el mAb NCL-P53-505 (Novocastra) y hAB OP43 (Calbiochem). Se adquirió antiactina (A3854) a través de Sigma. Los anticuerpos anti-PDGFRa (3164) y anti-PDGFRb (3169) se adquirieron a través de Cell Signaling. Alexa Fluor 568-Phalloidin (A12380) se adquirió a través de Invitrogen. Crenolanib (CP-868596) e imatinib (I-5508) se adquirieron a través de Selleckchem y LC Laboratories, respectivamente.

10 Cultivo celular y tratamientos farmacológicos

Todas las líneas celulares se mantuvieron en DMEM + FBS al 10%, a 37 °C en 5% de CO₂. Las líneas celulares estables que expresan ARNph se generaron mediante transferencia génica mediada por retrovirus. En resumen, las células envasadas por Phoenix o Ampho (para las líneas celulares murinas o humanas, respectivamente) se transfirieron mediante el método de fosfato de calcio con vectores que expresan NF-YA, NF-YB, p53, p73, PDGFRa, PDGFRb o los ARNph de control de renilla, y los virus generados se recolectaron para infectar KPC, KP_{fl}C o una serie de líneas celulares de cáncer de páncreas, mama, pulmón y colon humanos. Las células infectadas se seleccionaron con puromicina y los experimentos se llevaron a cabo en poblaciones de células derivadas. Para generar células que expresan en forma estable el p53 mutante, p73 o PDGFRb, se infectaron las células KP_{fl}C con MSCV-p53-R175H, MSCV-p53-R273H, PDGFRb o pcDNA3-HA-p73α y se seleccionaron en puromicina y G418 respectivamente para producir agrupaciones estables. Las células cultivadas se trataron con crenolanib 300 nm e imatinib 3 μM. Estas concentraciones se seleccionaron después de determinar la concentración requerida para inhibir completamente la fosforilación de PDGFRb sin ningún efecto sobre la proliferación celular.

25 Ensayos de cicatrización de heridas e invasión

Los ensayos de cicatrización de heridas se realizaron como se describió previamente (Goulimari et al., 2005). En resumen, las células se sembraron en placas de 6 pozos, se hicieron crecer hasta confluencia, y la herida se realizó con una punta de microtitulador de 10 μL que se cortó longitudinalmente. Los ensayos de invasión tridimensional se llevaron a cabo como se describió anteriormente (Kitzing et al., 2007). En resumen, los insertos Transwell de 24 pozos (Greiner bio-one) se recubrieron con colágeno tipo 1 (BD Biosciences) y se sembraron células en los insertos invertidos. Las cámaras inferiores se llenaron con medio que contenía FBS al 0,5% y las cámaras superiores que contenían la matriz de colágeno se llenaron con medio que contenía FBS al 20% y el quimioatrayente HGF.

35 Inmunotinción y microscopía

Las grabaciones de células vivas se realizaron inmediatamente después de la formación de la herida durante 18 ha 37 °C usando un microscopio de observación Zeiss. Las imágenes se adquirieron cada 10 minutos con una cámara Leica DC 350 FX controlada por motor, que permite grabaciones simultáneas de múltiples pozos. Para el análisis estadístico, la distancia de la herida desde cada pozo se midió por duplicado en tres ubicaciones del espacio de la herida definidas al azar por marco registrado por experimento. Los insertos del ensayo de invasión se fijaron con formaldehído al 4% y se tiñeron con DAPI y faloidina Alexa568 (Invitrogen) antes de realizar la microscopía confocal (Perkin Elmer Spinning Disk). Las imágenes fueron analizadas utilizando el software Imaris.

45 RT-qPCR

El ARN total se aisló usando TRIZOL (Invitrogen), y el ADNc se obtuvo usando los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems). La PCR en tiempo real se realizó por triplicado utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en el sistema de PCR en tiempo real ViiA^{MR} 7 (Invitrogen). GAPDH o β-actina sirvieron como controles de normalización endógenos. Las secuencias del cebador se enumeran a continuación:

Secuencias de cebadores para RT-qPCR

Símbolo del gen	Cebador Directo	Cebador Inverso
mPDGFRB.1	TTCCAGGAGTGATACCAGCTT	AGGGGGCGTGATGACTAGG
mPDGFRB.2	CGCCAGGGCGAGAGCATCAC	CGCCACTCTTCATGCGGGG
mPDGFRA.1	TCCATGCTAGACTCAGAAGTCA	TCCCGGTGGACACAATTTTTTC
mPDGFRA.2	ATGAGAGTGAGATCGAAGGCA	CGGCAAGGTATGATGGCAGAG
hPDGFRB.1	AGACACGGGAGAATACTTTTGC	AGTTCCTCGGCATCATTAGGG
hPDGFRB.2	GCAAACCACCATTGGGGAC	GGGTGATGTTCTCACCTGG
Trp73.1	CCACCTGCAGAACCTTACCA	TCATGGCTCTGCTTCAGGTC

Símbolo del gen	Cebador Directo	Cebador Inverso
Trp73.2	AAAATGGAGCTGCCAGCAAAC	TGGCGTCTTCTTCACGTTG
Actina		
Gapdh		

Secuenciación de ARN y análisis de datos

5 La secuenciación de nucleótidos de ARN de más de 200 nt de longitud se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito anteriormente (Djebali et al., 2012). Se generaron bibliotecas direccionales (de cadena) para la secuenciación de extremo emparejado (PE) en la plataforma Illumina como se describió anteriormente (Parkhomchuck et al., 2009). El procesamiento de datos primarios y el mapeo de la biblioteca se completaron utilizando el software de Alineación de transcripciones empalmadas con una referencia (STAR) (Dobin et al., 2013). El análisis de expresión diferencial para los datos del recuento de secuencias (valores FPKM) se realizó utilizando DESeq como se describió anteriormente (Anders y Huber, 2010).

Ensayo informador de luciferasa PDGFRb

15 El ensayo del promotor se realizó como se describió previamente (Hackzell et al., 2002). En resumen, las células se sembraron en placas de 24 pozos y se transfectaron transitoriamente con 0,5 µg de plásmido de expresión, 2,0 µg de plásmido indicador y 20 ng de vector de luciferasa de renilla (PGL4.74, Promega). Después de 36 h, se lisaron las células (sistema de ensayo de indicador de luciferasa dual, Promega), y se midieron las actividades de luciferasa y renilla de luciérnaga (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Scientific). Los resultados mostrados se normalizaron a la actividad de la renilla y son representativos de al menos tres réplicas independientes.

20 Inmunoprecipitación

25 Para detectar la unión de p53/p73 y p73/NF-Y, se infectaron células KP1C subconfluentes con p53 mutante o un constructo de control vacío y se transfectaron transitoriamente con HA.p73 (Addgene) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Treinta y seis horas después de la transfección, las células se lisaron en tampón RIPA (Tris 20 mM pH 7,4, TritonX-100 al 1%, NaCl 37 mM, EDTA 2 mM, SDS al 1%, NP-40 al 0,5%, glicerol al 10%, inhibidores de fosfatasa [pirofosfato de sodio 2,5 mM, β-glicerofosfato 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM] e inhibidores de la proteasa [Roche]). Los lisados de células enteras (0,5 mg de proteína) se eliminaron previamente con perlas de Sepharose A/G (Invitrogen), se incubaron a 4 °C con anticuerpo anti-HA (Covance, 16B12) o anti-p53 (Calbiochem, OP43) durante la noche y posteriormente con perlas de proteína A/G durante 2 h. El sedimento de perlas se lavó ampliamente en tampón de lisis tres veces y luego se sometió a electroforesis en geles de SDS-PAGE al 10% seguido de inmunotransferencia usando anticuerpos anti-p53, anti-HA, anti-GFP (Cell Signaling, 2555) y anti-NF-YB (Santa Cruz, FL-207).

35 Para medir los niveles de PDGFRb endógenamente fosforilado, las células KPC se trataron con el medicamento como se describe y se recolectaron en tampón de fosfo-lisis (Tris 50 mM pH 7,5, Tween-20 al 1%, NaCl 200 mM, NP-40 al 0,2%, inhibidores de la fosfatasa [pirofosfato de sodio 2,5 mM, β-glicerofosfato 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM] e inhibidores de la proteasa [Roche]). Se usó anti-PDGFRb (Santa Cruz, 958) para inmunoprecipitar PDGFRb de muestras de lisado de células enteras que contenían 0,5 mg de proteína. Los inmunoprecipitados lavados se sometieron a SDS-PAGE y se inmunotransfirieron con anticuerpo anti-PTyr-100 (Cell Signaling, 9411).

40 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

45 Los tejidos se fijaron durante la noche en formalina, se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de 5 µm de espesor. Las secciones se sometieron a tinción con hematoxilina y eosina, y tinción inmunohistoquímica e inmunofluorescente siguiendo protocolos estándar. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-GFP de ratón (Cell Signaling), anti-p-PDGFR-β de conejo (Tyr 1021) (Santa Cruz Biotechnology) y anti-CK8 de rata (DSHB). Para la inmunofluorescencia se usaron como anticuerpos secundarios, anticuerpos anti-conejo de cabra con Alexa Fluor 488 y anticuerpos anti-rata de cabra con Alexa Fluor 568, y DAPI se usó como un cromógeno. Las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio Zeiss Axio Imager D1.

50 Estudios con ratones

55 Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Memorial Sloan-Kettering. Para los estudios de colonización, las células KPC (1x10⁵) se resuspendieron en 200 µL de PBS y se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola de ratones desnudos atímicos hembra de 8 semanas de edad. Los pulmones fueron recogidos 7 días después de la inyección y analizados para la colonización por positividad de GFP (Nikon SMZ1500) e histología.

Se describieron previamente cepas de ratón *Pdx1-Cre* (Hingorani et al., 2003), *LSL-Kras^{G12D}* (Jackson et al., 2001) y *LSL-p53^{R172H}* (Olive et al., 2004): se criaron ratones machos *Pdx1-Cre^{+/+}*, *LSL-p53^{R172H/R172H}* con ratones hembra *LSL-Kras^{G12D/+}* para generar ratones KPC. Las cepas se mantuvieron en un fondo mixto. Los ratones se genotiparon mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa como se describió anteriormente (Hingorani et al., 2006). Los ratones se dosificaron dos veces al día por sonda oral con 50 mg/kg de imatinib en ddH₂O o solo con ddH₂O. Se extrajeron los órganos y tumores y se fijaron en formol tamponado al 10% y se evaluó la carga tumoral y metastásica mediante patología macroscópica e histología.

Conjuntos de datos humanos

Los datos de expresión génica y los análisis de supervivencia de pacientes con PDAC provienen del proyecto de cáncer de páncreas del Consorcio Internacional del Genoma del Cáncer (ICGC), que se almacenan en el Gene Expression Omnibus (GEO) con el número de acceso GSE50827. Incluye datos de expresión génica de 103 muestras de tumores primarios, 89 de los cuales contienen supervivencia libre de enfermedad y anotaciones clinicopatológicas, y se utilizan en el análisis de supervivencia de acuerdo con los métodos descritos anteriormente (Biankin et al., 2012).

Los datos de expresión génica de pacientes con cáncer de ovario, colorrectal y de páncreas con resultados clínicos anotados se descargaron de la base de datos Gene Expression Omnibus (GSE9899 (Tothill et al., 2008), GSE17537 (Smith et al., 2010) y GSE28735 (Zhang et al., 2012)). Los datos previamente procesados se descargaron como se proporciona en los archivos de matriz de datos (datos de microarreglos de expresión Affymetrix normalizados GCRMA/RMA) y se realizó un análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (GSEA) en cada conjunto después del centrado medio en las muestras. La media de las sondas por gen se utilizó para dar cuenta de la representación diferencial en el chip. Las puntuaciones de GSEA se agruparon en dos grupos ("Alto", "Bajo") usando K-medias, y se realizó un análisis de Kaplan-Meier para obtener gráficos de resultados de supervivencia. La significancia para estos gráficos se determinó utilizando la prueba Logrank.

Resultados

Se requiere la expresión sostenida de p53 mutante para el fenotipo invasivo de las células de cáncer de páncreas

Los modelos de ratones genéticamente modificados de cáncer de páncreas que albergan un alelo *Kras* oncogénico latente (*lox-stop-lox Kras^{G12D}*), un *p53^{R172H}* mutante latente, y una *Cre* recombinasa específica de tejido (*Pdx1-Cre*), también conocidos como ratones KPC, desarrollan cáncer pancreático altamente metastásico que imita fielmente la enfermedad humana (Hingorani et al., 2005). Para comprender el impacto de las mutaciones de p53 en la invasión y metástasis celular en este sistema genético bien definido, se empleó una línea celular de cáncer pancreático KPC murino que perdió el alelo de tipo silvestre p53 restante durante la progresión de la enfermedad (Morton et al., 2010). El comportamiento de las líneas celulares KPC que expresan de manera estable ARNph de p53 (mutante), o ARNph de control de *Renilla* (KPC+sh.Ctrl), se compararon entre sí y con una línea celular KP_{fl}C nula para p53 (de un *Pdx-Cre*, *LSL-Kras^{G12D/+}*, *LSL-p53^{loxP/+}*) que expresa el ARNph de control (KP_{fl}C+sh.Ctrl).

Las células KPC+sh.Ctrl que expresan p53 mutante migraron eficientemente para cerrar la herida usando un ensayo de herida por rascado. Esta motilidad dependía del p53 mutante, ya que la inactivación de p53 mutante en células KPC+sh.p53 redujo la motilidad de manera similar a las células KP_{fl}C+sh.Ctrl *p53^{-/-}* (Figura 1A). A continuación, se examinó la capacidad invasiva de las células KPC en geles de colágeno en un ensayo de invasión invertida. La presencia de p53 mutante en células KPC+sh.Ctrl mejoró la invasividad, que se anuló significativamente tras la inactivación de p53 (Figura 1B). La capacidad de p53 mutante para conducir la invasión celular también fue evidente después de la expresión forzada de *p53^{R175H}* y *p53^{R273H}*, dos mutantes que se encuentran con frecuencia en PDAC humano, en células KP_{fl}C. Este resultado indica que las diferencias en la invasividad de las células KPC y KP_{fl}C dependen de p53 mutante y no se adquirieron durante la generación y selección de poblaciones celulares que expresan ARNph o mediante efectos fuera del objetivo de ARNi.

Para probar si se requería la expresión de p53 mutante para mantener el potencial metastásico de las células KPC, se inyectaron ortotópicamente células KPC+sh.Ctrl y KPC+sh.p53 en los páncreas de ratones atímicos, y se puntuaron el número de metástasis formadas tanto en pulmón como en hígado, los sitios más comunes de propagación del cáncer de páncreas en pacientes. Aunque la carga tumoral primaria era independiente del estado de p53, los tumores que se originaban en células KPC+sh.Ctrl que expresan p53 mutante eran significativamente más metastásicos que aquellos en los que p53 mutante estaba silenciado, y se detectaron metástasis en el pulmón y el hígado en mayor medida en ratones que habían sido inyectados con células que expresan p53 mutante (Figura 1C). Juntos, estos resultados demuestran que p53 mutante puede contribuir a la invasión y metástasis de PDAC y que inhibir su actividad puede tener un efecto antimetastásico.

El perfil transcripcional y el cribado funcional identifica PDGFRb como un mediador secuencia abajo de p53 mutante en el cáncer de páncreas murino

Para obtener información sobre cómo el p53 mutante media en el fenotipo invasivo de PDAC, se realizó un perfil de transcriptoma de genoma completo de células KPC mediante secuenciación de ARN (ARNseq). Cuatro días después

de la inactivación de p53 mutante en tres poblaciones clonales dio como resultado un patrón complejo de cambios en la expresión génica en comparación con los observados en tres líneas celulares KPC+sh.Ctrl independientes. Se identificaron 441 genes ya sea significativamente sobrerregulados o subregulados tras el agotamiento de p53 mutante endógeno mediado por ARNph (Figuras 2A y 8A). La siguiente tabla enumera los 40 principales genes desregulados tras la inactivación de p53 mutante:

5

Listado de genes de 40 genes desregulados tras la inactivación de p53 mutante

SOBRERREGULADO	SUBREGULADO
Slc1a3	Pr2c3
Calm4	Nckap1l
Fgf13	Vmn1r44
4933439K11Rik	Gm14547
Lmo1	Armcx2
Gm13318	1600029D21Rik
Gpc4	4930452B06Rik
Pde9a	Trim54
Ptn	Pr2c2
Angpt1	Selp
Pde8a	Serpnb9g
Psmb8	Prrg1
Fam5c	Slc25a48
Ppp1r3c	Prokr2
5330417C22Rik	Rims2
Robo2	Fat2
Armcx6	Siglec15
Smarca1	Ctf1
Tmigd1	Spsb4
Sned1	Cd300b
Oprd1	Gm15854
Psmb9	Klk8
Sgk3	Igfbp3
Fam198a	I118rap
Fsd1	Fam110c
Nfkbid	Acsbg1
C4bp	9030425E11Rik
Nlgn1	Nefl
Cyp4b1	Tnnt2
Gatm	Atg9b
1110032A04Rik	Sck39
BC028528	Aqp8
Cul9	Tmem117
2610305D13Rik	Klra4
C1s	Wnt10a
Unc5c	Hck
Slc40a1	Kcnf1
Pdgfrb	Ripply1
Cacna1b	Fam78b
Bicc1	Slc25a43

El análisis de la ruta de Ingenuity reveló que menos del 20% de los genes afectados estaban involucrados en el programa de "movimiento celular", confirmando observaciones experimentales de que el p53 mutante puede gobernar el fenotipo invasivo de las células de cáncer de páncreas (Figuras 2B y 8C).

5 Para facilitar la identificación de mediadores de la actividad de p53 mutante, se analizaron genes cuya expresión estaba regulada positivamente por p53 mutante, ya que tales moléculas podrían mediar los efectos de p53 mutante y ser objetivos para la inhibición farmacológica. Por lo tanto, se generaron grupos de 3 a 6 ARNph de genes sobrerregulados y se cribaron uno por uno para identificar aquellos que fenocopiaron la disminución de la invasión observada tras la subregulación de p53 mutante. Se identificaron tres genes cuya inactivación de la invasión anulada impulsada por p53 mutante (Figura 2C). SLC40A1 es una proteína de membrana celular que media el flujo de salida de hierro celular (Montalbetti et al., 2013); SNED1 es un marcador estromal que induce resistencia al cisplatino en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Longatic et al., 2013); y PDGFRb es un receptor de tirosina quinasa que media la proliferación, la supervivencia y la quimiotaxis regulada por PDGF (Dai, 2010).

15 Se han estudiado las propiedades oncogénicas de PDGFRa mutado o amplificado en varios tipos de tumores, mientras que PDGFRb se ha relacionado con la angiogénesis tumoral mediante efectos paracrinicos (Pietras et al., 2003; Cao et al., 2004). El resultado de la detección descrita en el presente documento condujo a la hipótesis de un papel autónomo de células de PDGFRb en la invasión celular en el cáncer de páncreas. Primero, se verificó una reducción en el ARNm de PDGFRb y de proteína tras la inactivación de p53 mutante mediante RT-qPCR y transferencia Western (Figuras 2D y 2E). La expresión de p53 mutante se correlacionó con altos niveles de expresión de PDGFRb y también con la expresión de mediadores clave secuencia abajo de la cascada de señalización de PDGFRb (Figura 8B).

A continuación, los efectos del agotamiento de cada isoforma de PDGFR sobre el potencial invasivo de las células KPC se examinaron *in vitro* (Figura 3A). Aunque la inactivación de PDGFRa no tuvo efecto, el agotamiento de PDGFRb disminuyó la capacidad de invasión de las células KPC (Figura 3B). Por el contrario, la sobreexpresión de PDGFRb en KP₁C *p53*^{-/-} mejoró la migración e invasión celular, de manera similar a las células que sobreexpresan formas mutantes de p53 (Figura 9A). Los niveles reducidos de PDGFRb en células KPC no alteraron la tasa de proliferación celular (Figura 9B) ni condujeron a una desventaja proliferativa competitiva sobre las células KPC que expresan altos niveles de PDGFRb (Figura 9C). Cuando las células KPC+sh.PDGFRb positivas para GFP se mezclaron con células KPC+sh.Ctrl positivas para Cherry y se inyectaron por vía subcutánea en ratones atímicos, la relación de GFP:Cherry de células previamente inyectadas se mantuvo en los tumores establecidos, lo que indica que mayores niveles de PDGFRb no confirieron una ventaja selectiva a la proliferación de células tumorales en el sitio de inyección (Figura 9D). Por lo tanto, la actividad autónoma celular de PDGFRb no es necesaria para la proliferación y el potencial tumorigénico de las células de cáncer murino mutantes de p53, pero afecta específicamente su potencial invasivo.

35 PDGFRb media la acción p53 de mutante en células cancerosas humanas

Para determinar si el eje de señalización de p53 mutante-PDGFRb actúa en células cancerosas humanas, se analizaron los niveles de expresión de PDGFRb en un panel de líneas celulares de cáncer de páncreas humano. Como en nuestro modelo, los niveles de ARNm de PDGFRb fueron significativamente mayores en las células que expresan p53 mutante en comparación con las de las líneas celulares que mantuvieron o perdieron el alelo p53 de tipo silvestre (Figuras 3C y 10A). Además, la inactivación del p53 mutante en las líneas celulares Miapaca2, BXPC3, CFPAC y A2.1 (que transportan los alelos 248W, 220C, 242R y 155P, respectivamente) disminuyó los niveles de ARNm de PDGFRb en diversos grados (Figura 3D). La inactivación de p53 mutante también disminuyó PDGFRb en varias líneas celulares de cáncer de colon humano (SW620, *p53*^{273H/P309S}), pulmón (H1975, *p53*^{273H}) y mama (MDA-MB-231, *p53*^{280K}) (Figura 10C). Por lo tanto, la capacidad de p53 mutante para inducir niveles de PDGFRb no está estrictamente relacionada con un alelo p53 o tipo de tumor en particular.

La conexión funcional entre p53 mutante y PDGFRb en la promoción de la invasividad de las líneas de PDAC humano se analizó más a fondo. De acuerdo con los estudios en ratones, la inactivación de p53 mutante o PDGFRb redujo la invasividad de la línea celular de cáncer de páncreas A2.1 (Figura 3E). Por el contrario, la sobreexpresión de PDGFRb en la línea celular de cáncer de páncreas ASPC *p53*^{-/-} humano, mejoró la invasión en comparación con las células infectadas con un vector de control de GFP (Figura 10B). Colectivamente, estos resultados confirmaron que la sobrerregulación del receptor PDGFRb es importante para la acción de p53 mutante en PDAC y posiblemente otros tipos de tumores.

p53 mutante altera el complejo p73/NF-Y para mediar la expresión de PDGFRb y la invasión de células tumorales

Varias propiedades prooncogénicas de p53 mutante dependen de su capacidad para interactuar físicamente e inhibir a los miembros de la familia p53, p63 y p73 (Li y Prives, 2007). A pesar de su similitud con p63, el papel de p73 en la invasión y metástasis no se ha examinado directamente. Como informes anteriores indicaron que p73 puede reprimir la transcripción de *PDGFRB* (Hackzell et al., 2002), y porque nuestras células KPC expresaron p73 pero no p63 de acuerdo con lo determinado por ARNseq (datos no mostrados), se examinó si la interacción física de p53 mutante con p73 deteriora la capacidad de p73 para regular negativamente la expresión de PDGFRb.

65

Primero, la interacción entre p73 y las proteínas de p53 mutante se verificó mediante coimmunoprecipitación recíproca (Figura 4A) y, de acuerdo con informes anteriores, la unión de p73 a un p53 mutante de "conformación" (R175H) parecía más fuerte que a un mutante p53 de "unión a ADN" (R273H) (Gaiddon et al., 2001; Muller et al., 2009). A continuación, utilizando un indicador de luciferasa dirigido por el promotor *PDGFRB*, la sobreexpresión de p73 en células KPC disminuyó la actividad transcripcional de *PDGFRB* y, por el contrario, la inactivación de p73 endógeno aumentó la expresión de luciferasa (Figuras 4C y 11A). Se demostró un aumento similar en la señal de luciferasa tras la sobreexpresión de dos formas distintas de p53 mutante en células KPC (Figura 4C), así como una disminución significativa tras el agotamiento de p53 mutante o sobreexpresión de p73 en células KPC (Figura 11C). Es importante destacar que el agotamiento de p73 endógeno en células KPC que expresan p53 mutante no mejoró la transcripción de *PDGFRB* (Figura 11C), lo que indica que la actividad represora de p73 está regulada por su interacción con p53 mutante. Por lo tanto, p53 mutante cancela la capacidad de p73 para reprimir la transcripción de *PDGFRb*, lo que lleva a un aumento en su expresión.

Para comprender mejor cómo p73 reprime la transcripción de *PDGFRB*, se realizó un análisis de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en células KPC, pero no se detectó la unión directa de p73 al promotor del *PDGFRB* (datos no mostrados), un resultado consistente con informes anteriores (Matys et al., 2006). Sin embargo, el análisis del promotor de *PDGFRB* (Transfec®, Biobase) identificó un motivo de unión a CCAAT conservado para NF-Y, un activador transcripcional bien caracterizado de *PDGFRB* que interactúa físicamente con p73 (Ballagi et al., 1995; Ishisaki et al., 1997). La unión de NF-Y al promotor de *PDGFRB* se demostró usando el análisis de ChIP (Figura 4B). Sorprendentemente, esta unión se evitó por la sobreexpresión de p73, lo que sugiere que la interacción p73/NF-Y obstaculiza su capacidad para unirse y activar el promotor de *PDGFRB* (Figura 4B). De hecho, cuando p73 se inmunoprecipitó en células KPC, se detectó la unión directa de NF-Y a p73 (Figura 4A). Esta interacción se anuló tras la expresión de p53 mutante, lo que indica que interrumpe o interfiere con la formación del complejo represivo p73/NF-Y (Figura 4A).

A continuación, se evaluó si la acción represiva de p73 sobre la transcripción de *PDGFRB* fue mediada por NF-Y y modulada por p53 mutante, y las implicaciones de este circuito regulador para la invasión. Curiosamente, la capacidad de la sobreexpresión de p73 para inhibir el indicador de *PDGFRB*-luc fue abolida por el agotamiento de las subunidades A y B de NF-Y (Figuras 4D y 11B), y la inactivación de NF-Y suprimió la capacidad de p53 mutante para mejorar la expresión de *PDGFRb* en células KPC (Figura 11D). La sobreexpresión de p73 redujo el potencial invasivo de las células KPC, mientras que la inactivación de p73 o la sobreexpresión de p53 mutante aumentó significativamente la invasividad (Figura 4E). Por el contrario, como ocurrió en las células p53 mutantes después de la sobreexpresión de p73, el agotamiento de p53 también redujo el comportamiento invasivo en las células KPC (Figura 11E). Finalmente, la inactivación de NF-Y restauró el potencial invasivo de las células KPC que sobreexpresaron p73 (Figura 4F) y suprimió la capacidad de p53 mutante para mejorar la invasión celular (Figura 11F). Juntos, estos resultados respaldan un modelo en el que el p53 mutante promueve la invasión en las células cancerosas del páncreas a través de un mecanismo indirecto que depende de su capacidad para mejorar la expresión de *PDGFRb* a través de la interrupción del complejo represivo p73/NF-Y (Figura 4G).

La modulación de los niveles de expresión de *PDGFRb* media los efectos fenotípicos del agotamiento de p53 mutante *in vivo*

Tras la observación de que los mutantes p53 inducen la expresión de *PDGFRb* para promover la invasión celular en cultivos de PDAC, se investigó si los niveles de *PDGFRb* regulan el comportamiento metastásico de las células de PDAC en ratones. Con este fin, se realizó un ensayo de colonización pulmonar inyectando células KPC+sh.p53, KPC+sh.*PDGFRB*, KPC+sh.*PDGFRA* o KPC+sh.Ctrl por vía intravenosa a través de la vena de la cola en ratones atímicos y anotando el número de colonias formadas en los pulmones. Mientras que las células KPC+sh.Ctrl y KPC+sh.*PDGFRA* que expresan p53 mutante formaron nódulos tumorales en los pulmones con alta frecuencia, el agotamiento de *PDGFRb* redujo significativamente el número de colonias pulmonares, fenocopiando el efecto antimetastásico observado tras la inactivación de p53 mutante (Figuras 5A y 12A). Sin embargo, el agotamiento de *PDGFRb* no afectó el tamaño de los focos metastásicos, lo que sugiere que *PDGFRb* no altera su capacidad para crecer y proliferar en un nuevo entorno (Figura 12B). En secciones de pulmón completas, las señales positivas para GFP coincidieron con nódulos metastásicos, lo que indica que las metástasis se formaron a partir de células que expresan ARNph, y probablemente no a partir de la proliferación de células tumorales que perdieron la expresión de ARNph (Figura 12C).

Se examinó si la inhibición farmacológica de la vía *PDGFRb* recapitula los efectos de *PDGFRb* o el agotamiento de p53 mutante (Figura 5A y 12A). Se utilizó el compuesto crenolanib, que es un inhibidor de molécula pequeña de tirosina quinasas tipo III, potente contra *PDGFRA*, *PDGFRb* y *FLT3* pero no otros receptores conocidos de tirosina quinasas (*VEGFR*, *FGFR*), serina/treonina (*RAF*) o tirosina quinasas (*ABL1*) (Lewis et al., 2009). Se evaluó la potencia y eficacia de crenolanib en la inhibición de la viabilidad de células KPC murinas y de cáncer de páncreas A2.1 humanas. Los patrones de respuesta a la dosis fueron comparables entre las dos líneas celulares, con valores de IC_{50} de 13.1 μ M y 8.5 μ M, respectivamente (Figura 5B). Se logró una fuerte inhibición de la actividad de *PDGFRb*, medida por fosfo-*PDGFRb*, en ambas líneas celulares a 0,3 μ M, una dosis a la que no se observó toxicidad (Figuras 5C y 12D). Los experimentos a lo largo del tiempo revelaron que se logró una fuerte inhibición del objetivo dentro de los 10 minutos

posteriores al tratamiento farmacológico (Figura 12E). En consecuencia, el tratamiento con crenolanib de células KPC y A2.1 redujo sustancialmente la invasión en relación con la observada con células tratadas con DMSO (Figura 5D).

Para probar si el crenolanib puede suprimir la metástasis, las células KPC se trataron previamente con el fármaco durante la noche y se inyectaron por vía intravenosa en ratones receptores que posteriormente se evaluaron para determinar la formación de colonias en el pulmón. Aunque el tratamiento farmacológico no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de la población de células inyectadas, los ratones inyectados con células KPC tratadas con fármacos mostraron significativamente menos nódulos pulmonares en comparación con los controles previamente tratados con DMSO (Figuras 5E y 12F). Por el contrario, la misma concentración de crenolanib no redujo el potencial metastásico de las células KPC en un ensayo de colonización pulmonar, lo que sugiere que PDGFRb actúa de forma autónoma en las células KPC para potenciar la invasión celular y la metástasis (Figura 12G). Por lo tanto, la inhibición de la molécula pequeña de PDGFRb o el agotamiento por ARNi conduce a una reducción significativa de la invasión y metástasis impulsada por p53 mutante tanto *in vitro* como *in vivo*.

Imatinib inhibe el desarrollo de metástasis en un modelo de ratón de PDAC por direccionamiento de PDGFRb

Los resultados descritos anteriormente implican que la inhibición farmacológica de PDGFRb podría tener efectos antimetastásicos. Por lo tanto, se determinó si la inhibición de PDGFRb previno la metástasis en ratones KPC que desarrollan enfermedad metastásica con una latencia variable de 3 a 10 meses en 50 a 80% de los animales (Hingorani et al., 2005). Se utilizó imatinib aprobado por la FDA, un potente inhibidor de la actividad de PDGFRb, c-KIT y BCR-ABL. Cabe destacar que las quinasas c-KIT y BCR-ABL no se han relacionado con el desarrollo de PDAC (Jones et al., 2008).

La inhibición de PDGFRb por imatinib en células KPC redujo fuertemente la fosforilación de tirosina de PDGFRb a 3 μM (Figura 6A), una dosis del fármaco que fue significativamente menor que la requerida para inhibir la proliferación celular (IC_{50} de 29.7 μM) (Figura 13A). No obstante, el tratamiento con imatinib redujo significativamente el potencial invasivo de las células KPC *in vitro* (Figura 13B). Más importante aún, el tratamiento previo de las células KPC con imatinib disminuyó su potencial para colonizar los pulmones de los ratones atímicos receptores en un grado similar al observado con el tratamiento con crenolanib (Figura 6B).

A continuación, los ratones KPC fueron tratados con imatinib para evaluar sus efectos sobre las metástasis. Con este fin, los ratones fueron tratados con una dosis de 50 mg/kg de imatinib por sonda oral dos veces al día, un régimen que produce concentraciones terapéuticas de imatinib en ratones (Wolff et al., 2003; Beppu et al., 2004). El tratamiento se inició en ratones de 8 semanas de edad, momento en el que los ratones KPC desarrollaron lesiones preneoplásicas (Hingorani et al., 2005), y los ratones fueron monitoreados hasta que se volvieron sintomáticos. El imatinib no tuvo impacto en el volumen del tumor en el páncreas o en la supervivencia general, lo que sugiere que la alta carga de enfermedad en el páncreas fue la causa principal de muerte celular (Figuras 6C y 13C).

Sin embargo, el imatinib indujo una reducción notable en la aparición de metástasis. La incidencia de metástasis fue del 92% en animales tratados con vehículo en comparación con el 15% en ratones tratados con imatinib, de acuerdo con lo evaluado por fluorescencia de GFP y confirmado por análisis histopatológicos (prueba χ^2 , $p < 0.0001$) (Figuras 6D y 13D). El efecto antimetastásico se observó en varios órganos como el hígado, los ganglios linfáticos y los pulmones (Figuras 6E y 6F). El imatinib inhibió efectivamente la actividad de PDGFRb en tumores primarios basándose en niveles reducidos de fosfo-PDGFRb en las células tumorales (Figuras 6G y 13E). Juntos, estos datos sugieren que al inhibir la actividad quinasa de PDGFRb, imatinib disminuye significativamente el potencial metastásico de las células cancerosas, tal como las células de cáncer de páncreas.

La expresión de PDGFRb se correlaciona con la supervivencia libre de enfermedad en pacientes humanos con cáncer de páncreas, colorrectal y ovario

Para investigar la importancia clínica de la expresión de PDGFRb, se examinó si la sobreexpresión de este gen estaba correlacionada con el pronóstico o con las características clínico-patológicas de los PDAC en pacientes. Para evitar señales de confusión del estroma tumoral, que pueden ser sustanciales (datos no mostrados), los niveles de ARNm de PDGFRb se evaluaron en muestras de tumor microdisecionadas por RT-qPCR. Sorprendentemente, los pacientes con cáncer de páncreas con tumores que expresan altos niveles de PDGFRb mostraron una pobre supervivencia libre de enfermedad y, por lo tanto, un menor tiempo de recaída, incluidas metástasis en órganos distantes ($p = 0.019$) (Figura 7A). Además, los niveles de expresión de PDGFRb se elevaron significativamente en el PDAC de etapa tardía en comparación con las etapas anteriores (Figura 7B). Los pacientes con niveles altos de PDGFRb también mostraron un aumento en las células tumorales que invaden el espacio vascular, otra característica clínico-patológica de la diseminación tumoral (Figura 7C). A continuación, se analizó si los niveles de PDGFRb se correlacionaban con el estado de p53 analizando un panel de microarreglos de tejido de PDAC (TMA). De manera muy importante, se observaron niveles significativamente más altos de PDGFRb activado en aquellos tumores que mostraron una acumulación de p53 ($p = 0.004$), que generalmente representa tumores con mutación p53 (Cooks et al., 2013) (Figuras 7D y 14A). Estos resultados confirmaron los resultados obtenidos con ratones y subrayan el papel de p53 mutante en la regulación de la señalización de PDGF en el cáncer de páncreas humano.

También se analizó la importancia clínica de PDGFRb en el cáncer colorrectal y de ovario, y los niveles de PDGFRb estratificaron significativamente a los pacientes con tumor colorrectal y de ovario en dos cohortes distintas. Los pacientes con tumores que expresan niveles bajos de PDGFRb exhibieron una menor probabilidad de formar metástasis en comparación con los pacientes con tumores que expresan altamente PDGFRb ($p = 0.003$ y $p < 0.0001$) (Figuras 7E y 14C). Al igual que en PDAC, se observó un aumento significativo en la expresión de PDGFRb en los cánceres colorrectales en estadio superior (Figura 7F). Además de PDGFRb, la firma del gen p53 mutante obtuvo un puntaje significativo como marcador pronóstico en pacientes con tumor colorrectal y de ovario (los 40 genes principales sobrerregulados en células KPC; Figura 2C). Cuando se analizaron los tres genes que puntuaron en el cribado del ensayo de invasión de la divulgación, el gen *PDGFRB* fue el predictor más fuerte de la probabilidad de desarrollar metástasis en pacientes con cáncer colorrectal y de ovario (Figuras 14B y 14C). En resumen, de acuerdo con los estudios funcionales descritos en este documento, la expresión elevada de PDGFRb se correlacionó significativamente con el estado de p53, el estatus tumoral más alto y una tasa de supervivencia libre de enfermedad más pobre en pacientes con cáncer de páncreas, colorrectal y ovario.

15 Discusión

Las mutaciones que se producen en el supresor tumoral p53 pueden inactivar las funciones de p53 de tipo silvestre, pero también pueden producir propiedades oncogénicas de "ganancia de función" que pueden contribuir a la proliferación celular, la supervivencia y la metástasis. En el presente documento se describen los resultados del análisis de los efectos fenotípicos de p53 mutante en el cáncer de páncreas. Como se demuestra en el presente documento, la expresión sostenida del alelo p53 mutante es necesaria para mantener el fenotipo invasivo de las células de PDAC al aumentar la expresión de PDGFRb. Estos resultados tienen varias ramificaciones para comprender la acción de p53 mutante, así como el comportamiento y el posible tratamiento del cáncer de páncreas.

La señalización a través de PDGFRb puede contribuir a múltiples procesos relacionados con el tumor, incluida la invasión celular y la metástasis. Dada la expresión generalmente restringida de PDGFRb a los tipos de células mesenquimatosas, se cree que la mayoría de sus propiedades oncogénicas reflejan los efectos paracrinos del PDGF secretado por células tumorales. De hecho, el trabajo previo sobre el papel de PDGFRb en la progresión del carcinoma y la metástasis sugiere que principalmente provoca respuestas en el estroma tumoral al promover la angiogénesis tumoral (Pietras et al., 2003; Cao et al., 2004). Por el contrario, los resultados descritos en este documento proporcionan nuevas pruebas para la expresión específica de células tumorales de PDGFRb en la promoción de metástasis. Como se demuestra en el presente documento, la inhibición genética o farmacológica de PDGFRb en las células cancerosas mismas de páncreas redujo drásticamente su potencial invasivo y metastásico, y ese tratamiento de ratones que albergan tumores genéticos e histológicamente relevantes previno la diseminación metastásica *in vivo*. Juntos, estos datos sugieren que las células tumorales pancreáticas que expresan p53 mutante no solo sintetizan PDGF sino que también sobrerregulan PDGFRb, lo que conduce a un efecto autónomo de células tumorales.

Aunque los aumentos en la expresión de PDGFRb fueron necesarios y suficientes para mediar los efectos de p53 mutante en el modelo descrito en el presente documento, se identificaron al menos dos genes adicionales (*SNED1* y *SLC40A1*) que también contribuyen al fenotipo invasivo a través de mecanismos aún desconocidos. Los estudios en otros sistemas, principalmente el cáncer de mama, han sugerido que CXCR4, ciclina-G2 y la vía del mevalonato son mediadores de las actividades pro-metastásicas de p53 mutante (Mehta et al., 2007; Adorno et al., 2009; Freed- Pastor et al., 2012). Además, también se ha informado que el p53 mutante impulsa la invasión regulando varios miARN tales como miR155 y miR130b (Nielsen et al., 2013; Dong et al., 2013). En concordancia, se encontró que miR155 estaba regulado positivamente por p53 mutante en células KPC y promovió la metástasis en el modelo descrito en este documento (datos no mostrados); sin embargo, en contraste con un informe anterior (Su et al., 2010), no se observaron efectos sobre la expresión de DICER, argumentando que en el cáncer de páncreas los cambios asociados a p53 mutante en la expresión de microARN y la metástasis son independientes de DICER. Independientemente, en cuanto a p53 de tipo silvestre, p53 mutante ejerce efectos a través de la regulación de múltiples genes en lugar de modular una sola vía de señalización.

La mayor parte de la comprensión previa de cómo el p53 mutante media su actividad oncogénica implicaba explorar las consecuencias de la interacción física entre la proteína mutante y los miembros de la familia p53, p63 y p73. Mientras que la interacción p53 mutante-p63 puede modular la expresión de los genes objetivo p63 para mejorar la invasión y la metástasis (Adorno et al., 2009; Muller et al., 2009; Girardini et al., 2011), el papel de p73 en estas propiedades oncogénicas era desconocido. Estudios previos han demostrado que (1) la pérdida de p73 en un fondo nulo para p53 podría ser funcionalmente equivalente a la expresión de p53 mutante (Flores et al., 2005; Lang et al., 2004); (2) la regulación transcripcional aberrante por p53 mutante está mediada a través del activador transcripcional NF- κ B (Di Agostino et al., 2006); y (3) p53 mutante promueve el reciclaje de los receptores de tirosina quinasas para iniciar la invasión (Muller et al., 2009). En el presente se demuestra, entre otras cosas, un mecanismo en el que p53 mutante mejora el potencial metastásico de las células de cáncer de páncreas al modular p73 y su interacción con el activador transcripcional NF- κ B.

Las mutaciones en *KRAS*, *p53*, *CDKN2A*, *BRCA2* y *SMAD4* definen el panorama genético de PDAC. En el presente se proporciona evidencia de un papel crucial de p53 mutante en la formación de metástasis, lo que respalda el atractivo concepto de dirigir sus actividades de ganancia de función para limitar la diseminación y metástasis de las células

cancerosas. Sin embargo, el p53 mutante no ha sido ni una proteína de la superficie celular direccionable ni una enzima con capacidad farmacológica (Levine y Oren, 2009), y las modalidades terapéuticas tales como el ARNi o la restauración de las conformaciones de p53 de tipo silvestre no han demostrado eficacia en estudios clínicos (Lehmann y Pietenpol, 2012). Por lo tanto, el direccionamiento de las rutas o genes secuencia abajo que median la actividad de p53 mutante, tales como PDGFRb como se describe en este documento, plantea una estrategia de tratamiento alternativa. Por ejemplo, los métodos de la divulgación incluyen el tratamiento y/o la inhibición de la diseminación metastásica temprana del cáncer de páncreas direccionando a PDGFRb después de la detección temprana, tal como un enfoque preventivo en pacientes con predisposición familiar al desarrollo de cáncer. En algunas realizaciones, el direccionamiento de PDGFRb se usa en combinación con una o más terapias adicionales, tal como después de la resección quirúrgica de la enfermedad localizada.

Además, los datos divulgados en el presente documento demostraron correlaciones entre niveles elevados de PDGFRb, estadio tumoral más avanzado y peor supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer de páncreas así como colorrectal y de ovario. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la divulgación incluye el uso de niveles de PDGFRb como un biomarcador de pronóstico para la progresión del cáncer de páncreas. Por ejemplo, los niveles de PDGFRb se pueden usar junto con p53 para identificar cohortes de pacientes que puedan responder a las terapias dirigidas a este eje.

Referencias

Adorno, M., Cordenonsi, M., Montagner, M., Dupont, S., Wong, C., Hann, B., Solari, A., Bobisse, S., Rondina, M.B., Guzzardo, V., et al. (2009). A Mutant p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell* 137, 87-98.

Ballagi, AE., Ishizaki, A., Nehlin JO., y Funa, K. (1995). Isolation and characterization of the mouse PDGF betareceptor promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 210, 165-173.

Beppu, K., Jaboine, J., Merchant, MS., Mackall, CL., y Thiele, CJ. (2004). Effect of imatinib mesylate on neuroblastoma tumorigenesis and vascular endothelial growth factor expression. *J Natl Cancer Inst.* 96, 46-55.

Biankin, A.V., Waddell, N., Kassahn, K.S., Gingras, M.C., Muthuswamy, L.B., Johns, A.L., Miller, D.K., Wilson, P.J., Patch, A.M., Wu, J., et al. (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 491, 399-405.

Brosh, R., y Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field." *Nat Rev Cancer* 9, 701-713.

Cao, R., Björndahl, MA., Religa, P., Clasper, S., Garvin, S., Gaiter, D., Meister, B., Ikomi, F., Tritsaris, K., Dissing, S., et al. (2004). PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell* 6, 333-345.

Dai, C., Celestino, J.C., Okada, Y., Louis, D.N., Fuller, G.N., y Holland, E.C. (2001). PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. *Genes Dev* 15, 1913-1925.

Dai, Y. (2010). Platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a review of the recent patent literature. *Expert Opin Ther Pat* 20, 885-897.

Di Agostino, S., Strano, S., Emiliozzi, V., Zerbini, V., Mottolese, M., Sacchi, A., Blandino, G., y Piaggio, G. (2006). Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer Cell* 10, 191-202.

Djebali, S., Davis, C., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., Xue, C., et al. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489, 101-108.

Dobin, A., Davis, C., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, TR. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15-21.

Dong, P., Karaayvaz, M., Jia, N., Kaneuchi, M., Hamada, J., Watari, H., Sudo, S., Ju, J., y Sakuragi, N. (2013). Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene* 32, 3286-3295.

Freed-Pastor, WA., Mizuno, H., Zhao, X., Langerød, A., Moon, SH., Rodriguez-Barrueco, R., Barsotti, A., Chicas, A., Li, W., Polotskaia, A., et al. (2012). Mutant p53 Disrupts Mammary Tissue Architecture via the Mevalonate Pathway. *Cell* 148, 244-258.

- Gaiddon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T., y Prives, C. (2001). A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol.* 21, 1874-1887.
- 5 Girardini, JE., Napoli, M., Piazza, S., Rustighi, A., Marotta, C., Radaelli, E., Capaci, V., Jordan, L., Quinlan, P., Thompson, A., et al. (2011). A Pin1/mutant p53 axis promotes aggressiveness in breast cancer. *Cancer Cell* 12, 79-91.
- 10 Goulmari, P., Kitzing, T., Knieling, H., Brandt, DT., Offermanns, S., y Grosse, R. (2005). Galpha12/13 is essential for directed cell migration and localized Rho-Dia1 function. *J Biol Chem.* 280, 42242-42251.
- 15 Gril, B., Palmirie, D., Qian, Y., Anwar, T., Liewehr, DJ., Steinberg, SM., Andreu, Z., Masana, D., Fernández, P., Steeg, PS., et al. (2013). Pazopanib inhibits the activation of PDGFR β -expressing astrocytes in the brain metastatic microenvironment of breast cancer cells. *Am J Pathol.* 182, 2368-2379
- 20 Hackzell, A., Uramoto, H., Izumi, H., Kohno, K., y Funa, K. (2002). p73 independent of c-Myc represses transcription of platelet-derived growth factor beta-receptor through interaction with NF-Y. *J Biol Chem.* 277, 39769-39776.
- Hemann, MT., Fridman, J., Zilfou, JT., Hernando, E., Paddison, PJ., Cordon-Cardo, C., Hannon, GJ., y Lowe, SW. (2003). An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable ARNi produces distinct tumor phenotypes in vivo. *Nat Genet.* 33, 396-400.
- Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 362: 1605-1617.
- 25 Hingorani, SR., Petricoin, E., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, MA., Ross, S., Conrads, TP., Veenstra, TD., Hitt, BA., et al. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4, 437-450.
- 30 Hingorani, SR., Wang, L., Multani, AS., Combs, C., Deramaudt, TB., Hruban, RH., Rustgi, AK., Chang, S., y Tuveson, DA. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7, 469-483.
- 35 Hoehler, T., von Wichert, G., Schimanski, C., Kanzler, S., Moehler, MH., Hinke, A., Seufferlein, T., Siebler, J., Hochhaus, A., Arnold, D., et al. (2013). Phase I/II trial of capecitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab and imatinib in patients with metastatic colorectal cancer: AIO KRK 0205. *Br J Cancer.* Sep 17, 1408-1413.
- Ishisaki, A., Muramaya, T., Ballagi, AE., y Funa, K. (1997). Nuclear factor Y controls the basal transcription activity of the mouse platelet-derived-growth-factor beta-receptor gene. *Eur J Biochem* 246, 142-146.
- 40 Jackson, EL., Willis, N., Mercer, K., Bronson, RT., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., y Tuveson, DA. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev.* 15, 3243-3248.
- Joerger, AC., Ang, H., y Fersht, AR. (2006). Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *PNAS* 103, 15056-15061.
- 45 Jones, S., Zhang, X., Parsons, DW., Lin, JC., Leary, RJ., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., y Jimeno, A., (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321, 1801-1806.
- 50 Kim, Y., Kim, E., Wu, Q., Guryanova, O., Hitomi, M., Lathia, JD., Serwanski, D., Sloan, AE., Weil, RJ., Lee, J., et al. (2012). Platelet-derived growth factor receptors differentially inform intertumoral and intratumoral heterogeneity. *Genes Dev.* 26, 1247-1262.
- Lehmann, BD., y Pietsenpol, JA. (2012). Targeting Mutant p53 in Human Tumors." *J Clin Oncol.* 30, 3648-3650.
- 55 Levesque, MA., Katsaros, D., Yu, H., Zola, P., Sismondi, P., Giardina, G., Diamandis, EP. (1995). Mutant p53 protein overexpression is associated with poor outcome in patients with well or moderately differentiated ovarian carcinoma. *Cancer.* 15, 1327-38.
- 60 Levin, AR., y Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer* 9, 749-758.
- 65 Lewis, NL., Lewis LD., Eder, JP., Reddy, NJ., Guo, F., Pierce, KJ., Olszanski, AJ., y Cohen, RB. (2009). Phase I study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of oral CP-868,596, a highly specific platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced cancers. *J Clin Oncol.* 27, 5262-5269.
- Li, D., Xie, K., Wolff, R., y Abbruzzese, JL. (2004). Pancreatic Cancer. *Lancet* 363, 1049-1057.

- Li, Y., y Prives, C. (2007). "Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function?" *Oncogene* 26, 2220-2225.
- 5 Liu, K., Ling, S., y Lin, WC. (2011). TopBP1 mediates mutant p53 gain of function through NF-Y and p63/p73. *Mol Cell Biol.* 31, 4464-4481.
- Longati, P., Jia, X., Eimer, J., Wagman, A., Witt, MR., Rehnmark, S., Verbeke, C., Toftgård, R., Löhr, M., y Heuchel, RL. (2013). 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model
10 for drug testing. *BMC Cancer* 13, 95.
- Maitra, A., y Hruban, RH. (2008). Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol.* 3, 157-188.
- Masciarelli, S., Fontemaggi, G., Di Agostino, S., Donzelli, S., Carcarino, E., Strano, S., y Blandino, G. (2013). Gain-of-function mutant p53 downregulates miR-223 contributing to chemoresistance of cultured tumor cells. *Oncogene*, 15 April 2013; doi:10.1038/onc.2013.106.
- 15 Mathey, S., Graeser, M., Zu Eulenburg, C., Woelber, L., Trillsch, F., Jaenicke, F., Müller, V., Milde-Langosch, K., y Mahner, S. (2013). Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta Serum Concentrations during First-Line Therapy in Ovarian Cancer. *Oncology* 85, 69-77.
- 20 Matys, V., Kel-Margoulis, OV., Fricke, E., Liebich, I., Land, S., Barre-Dirrie, A., Reuter, I., Chekmenev, D., Krull, M., Hornischer, K., et al. (2006). TRANSFAC® and its module TRANSCompel®: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 34, D108-110.
- 25 Mehta, SA., Christopherson, KW., Bhat-Nakshatri, P., Goulet, RJ Jr., Broxmeyer, HE., Kopelovich, L., y Nakshatri, H. (2007). Negative regulation of chemokine receptor CXCR4 by tumor suppressor p53 in breast cancer cells: implications of p53 mutation or isoform expression on breast cancer cell invasion. *Oncogene.* 17, 3329-3337.
- 30 Montalbetti, N., Simonin, A., Kovacs, G., y Hediger, MA. (2013) Mammalian iron transporters: families SLC11 and SLC40. *Mol Aspects* 34, 270-287.
- Morton, JP., Timpson, P., Karim, SA., Ridgway, RA., Athineos, D., Doyle, B., Jamieson, NB., Oien, KA., Lowy, AM., Brunton, VG., et al. (2010). Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *PNAS* 107, 246-251.
- 35 Muller, PA., Caswell, PT., Doyle, B., Iwanicki, MP., Tan, EH., Karim, S., Lukashchuk, N., Gillespie, DA., Ludwig, RL., Gosselin, P., et al. (2009). Mutant p53 Drives Invasion by Promoting Integrin Recycling. *Cell* 139, 1327-1341.
- 40 Neilsen, PM., Noll, JE., Mattiske, S., Bracken, CP., Gregory, PA., Schulz, RB., Lim, SP., Kumar, R., Suetani, RJ., Goodall, GJ., et al. (2013). Mutant p53 drives invasion in breast tumors through up-regulation of miR-155. *Oncogene* 13, 2992-3000.
- Olive, KP., Tuveson, D., Ruhe, ZC., Yin, B., Willis, NA., Bronson, RT., Crowley, D., y Jacks, T. (2004). Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119, 847-860.
- 45 Oren, M., y Rotter, V. (2010). Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a001107.
- Parkhomchuk, D., Borodina, T., Amstislavskiy, V., Banaru, M., Hallen, L., Krobitch, S., Lehrach, H., y Soldatov, A. (2009). Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. *Nucleic Acids Res.* 37, e123.
- 50 Pietras, K., Sjoblom, T., Rubin, K., Heldin, C.H., y Ostman, A. (2003). PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell* 3, 439-443.
- Rolley, N., Butcher, S., y Milner, J. (1995). Specific DNA binding by different classes of human p53 mutants. *Oncogene.* 11, 763-770.
- 55 Su, X., Chakravarti, D., Cho, MS., Liu, L., Gi, YJ., Lin, YL., Leung, ML., El-Naggar, A., Creighton, CJ., Suraokar, MB., et al. (2010). TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature* 467, 986-990.
- 60 Uramoto, H., Wetterskog, D., Hackzell, A., Matsumoto, y Y., Funa, K. (2004). p73 competes with co-activators and recruits histone deacetylase to NF-Y in the repression of PDGF beta-receptor. *J Cell Sci.* 117, 5323-5331.
- Vogelstein, B., Lane, D., y Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- 65

Wang, P., Reed, M., Wang, Y., Mayr, G., Stenger, J.E., Anderson, M.E., Schwedes, J.F., Tegtmeyer, P. (1994). p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol Cell Biol.* 8:5182-5191.

Weisz, L., Oren, M., y Rotter, V. (2007). Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene* 26, 2202-2211.

5 Wolff, NC., Richardson, JA., Egorin, M., e Ilaria, RL Jr (2003). The CNS is a sanctuary for leukemic cells in mice receiving imatinib mesylate for Bcr/Abl-induced leukemia. *Blood* 101, 5010-5013.

10 Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., Kamiyama, M., Hruban, RH., Eshleman, JR., Nowak, MA., et al. (2010). Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 467, 1114-1117.

Zuber, J., McJunkin, K., Fellmann, C., Dow, LE., Taylor, MJ., Hannon, GJ., y Lowe, SW. (2011). Toolkit for evaluating genes required for proliferation and survival using tetracycline-regulated ARNi. *Nat Biotechnol.* 29, 79-83.

15 **Secuencias**

SEQ ID NO.: 1 (Secuencia de nucleótidos de p53 humano)

```

1  cgtgctttcc acgacggtga cacgcttccc tggattggcc agactgcctt ccgggtcact
61  gccatggagg agccgcagtc agatcctage gtcgagcccc ctctgagtcg ggaaacattt
121 tcagacctat ggaaactact tcctgaaaac aacgttctgt cccocttgcc gtcccaagca
181 atgatgatt tgatgctgtc cccggacgat attgaacaat ggttcactga agaccagggt
241 ccagatgaag ctcccagaat gccagaggct gctccccgcg tggcccctgc accagcagct
301 cctacaccgg cggcccctgc accagcccc tcctggcccc tgteatcttc tgtcccttcc
361 cagaaaacct accagggcag ctacggtttc cgtctgggct tcttgcatte tgggacagcc
421 aagtctgtga cttgcacgta ctcccctgcc ctcaacaaga tgttttgcca actggccaag
481 acctgccctg tgcagctgtg ggttgattcc acacccccgc cgggcacccg cgtccgcgcc
541 atggccatct acaagcagtc acagcacatg acggagggtg tgaggcgctg cccccaccat
601 gagcgctgct cagatagcga tggctctggc cctcctcagc atcttatccg agtggaaagga
661 aatttgctgt tggagtattt ggatgacaga aacacttttc gacatagtgt ggtggtgccc
721 tatgagccgc ctgaggttgg ctctgactgt accaccatcc actacaacta actgtgtaac
781 agttcctgca tgggcggcat gaaccggagg cccatcctca ccatcatcac actggaagac
841 tccagtggta atctactggg acggaacagc tttgaggtgc atgtttgtgc ctgtcctggg
901 agagaccggc gcacagagga agagaatctc cgcaagaaag gggagcctca ccacgagctg
961 ccccagggga gactaagcg agcactgtcc aacaacacca gctcctctcc ccagccaag
1021 aagaaaccac tggatggaga atatttcacc cttcagatcc gtgggcgtga gcgcttcgag
1081 atgttccgag agctgaatga ggccttggaa ctcaaggatg cccaggctgg gaaggagcca
1141 ggggggagca gggctcactc cagccacctg aagtcacaaa agggtcagtc tacctcccgc
1201 cataaaaaac tcatgttcaa gacagaaggg cctgactcag actgacatte gccacttctt
1261 gtcccccact gacagcctcc caccoccatc tctccctccc ctgccatfff tgggtttggg
1321 tctttgaacc cttgcttgca atagggtgtg gtcagaagca cccaggactt ccatttgctt
1381 tgtcccgggg ctccactgaa caagttggcc tgcactggtg ttttgttgtg gggaggagga
1441 tggggagtag gacataaccg cttagatttt aaggttttta ctgtgagggg tgtttgggag
1501 atgtaagaaa tgttcttgca gttaaggggt agtttacaat cagccacatt ctaggtaggg
1561 gccacttcoa ccgtactaac cagggaaagt gtcctcact gttgaatfff ctctaacttc
1621 aaggccata tctgtgaaat gctggcattt gcacctacct cacagagtgc attgtgaggg
1681 ttaatgaaat aatgtacatc tggccttgaa accacctfff attacatggg gtctagaact
1741 tgaccocctt gaggggtgctt gttccctctc cctgttggtc ggtgggtgg tagtttctac
1801 agttgggcag ctggttaggt agagggagtt gtcaagtctc tgetggccca gccaaacct
1861 gtctgacaac ctcttggtga acctagtagc ctaaaaggaa atctcaccac atcccacacc
1921 ctggaggatt tcatctcttg tatatgatga tctggatcca ccaagacttg ttttatgctc
1981 agggccaatt tctttttct ttttttttt tttttcttt ttctttgaga ctgggtctcg
2041 ctttgttgc caggctggag tggagtggcg tgatcttggc ttactgcagc ctttgcttcc
2101 ccgctctgag cagtctgccc tcagcctccg gagtagctgg gaccacaggt tcatgccacc
2161 atggccagcc aacttttgca tgtttttag agatggggtc tcacagtgtt gccagggctg
2221 gtctcaaac cctgggctca ggcgatccac ctgtctcagc ctcccagagt gctgggatta
2281 caattgtgag ccaccagtc cagctggaag ggtcaacatc ttttacatc tgcaagcaca
2341 tctgcatttt caccaccacc ttcccctct tctccctttt tatatcccat ttttatatcg
2401 atctcttatt ttacaataaa actttgctgc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa a
    
```

20 SEQ ID NO.: 2 (Secuencia de aminoácidos de p53 humano)

ES 2 773 631 T3

10 20 30 40 50 60
MEEPQSDPSV EPPLSQETFS DLWKLLPENN VLSPLPSQAM DDLMLSPDDI EQWFTEDPGP

70 80 90 100 110 120
DEAPRMPEAA PRVAPAPAAP TPAAPAPAPS WPLSSSVPSQ KTYQGSYGFR LGFLHSGTAK

130 140 150 160 170 180
SVTCTYSPAL NKMFCQLAKT CPVQLWVDST PPPGTRVRAM AIYKQSQHMT EVVRRCPHHE

190 200 210 220 230 240
RCSDSDGLAP PQHLIRVEGN LRVEYLDDRN TFRHSVVVPY EPPEVGS DCT TIHYNMCNS

250 260 270 280 290 300
SCMGMNRRP ILTIITLEDS SGNLLGRNSF EVRVCACPGR DRRTEENLR KKGEPPHELP

310 320 330 340 350 360
PGSTKRALPN NTSSSPQPKK KPLDGEYFTL QIRGRERFEM FRELNEALEL KDAQAGKEPG

370 380 390
GSAHSSHLK SKKGQSTSRH KKLMFKTEGP DSD

5 SEQ ID NO.: 3 (Secuencia de nucleótidos de PDGFRb humano)

ES 2 773 631 T3

```

1 ctctgaggc tgcagcagc cagcagtgac tgcccgcct atctgggacc caggatcgt
61 ctgtgagcaa cttggagcca gagaggagat caacaaggag gaggagagag ccggcccctc
121 agccctgctg cccagcagca gcctgtgctc gccctgcca acgcagacag ccagaccag
181 ggcgcccct ctggcggtc tgctcctccc gaaggatgct tggggagtga ggcaagctg
241 ggcegtcct ctcccctaca gcagcccct tcctccatcc ctctgttctc ctgagccttc
301 aggagcctgc accagtctg cctgtccttc tactcagctg ttaccactc tgggaccagc
361 agtctttctg ataactggga gagggcagta aggaggactt cctggagggg gtgactgtcc
421 agagcctgga actgtgcca caccagaagc catcagcagc aaggacacca tgcggcttcc
481 ggggtgcgat ccagctctgg cctcaaagg cgagctgctg ttgtgtctc tcctgttact
541 tctggaacca cagatctctc agggcctggt cgtcacaccc ccggggccag agcttgtcct
601 caatgtctcc agcaccttc ttctgacctg ctcggttca gctccgggtg tgtgggaacg
661 gatgtcccag gagccccac aggaaatggc caaggcccag gatggcacct tctccagcgt
721 gtcacaactg accaacctca ctgggctaga cacgggagaa tacttttgca cccacaatga
781 ctcccgtgga ctgggagacc atgagcggaa acggctctac atctttgtgc cagatcccac
841 cgtgggcttc ctccctaatg atgccgagga actattcatc tttctcagg aaataactga
901 gatcaccatt ccatgccgag taacagaccc acagctggtg gtgacactgc acgagaagaa
961 aggggacgtt gcactgectg tcccctatga tcaccaactg ggcttttctg gtatctttga
1021 ggacagaagc tacatctgca aaaccacat tggggacagg gaggtggatt ctgatgccta
1081 ctatgtctac agactccagg tgatccat caacgtctct gtgaacgcag tgcagactgt
1141 ggtccgccag ggtgagaaca tcacctcat gtgcattgtg atcgggaatg aggtggtcaa
1201 ctctgagtgg acatacccc gcaaagaaag tggcggtg gtggagccgg tgactgactt
1261 cctcttggt atgccttacc acatccgctc catcctgcac atccccagtg ccgagttaga
1321 agactcgggg acctacacct gcaatgtgac ggagagtgtg aatgaccatc aggatgaaa
1381 ggccatcaac atcaccgtgg ttgagagcgg ctacgtgagg ctctgggag aggtgggcaac
1441 actacaattt gctgagctgc atcggagccg gacactgcag gtagtgctc aggcctaccc
1501 accgcccact gtctgtggt tcaaagacaa ccgcacctg ggcgactcca gcgctggcga
1561 aatcgccctg tccacgcgca acgtgtcggg gacccgggat gtgtcagagc tgactgggt
1621 tcgctgaaag gtggcagagg ctggcacta caccatgagg gccttccatg aggatgctga
1681 ggtccagctc tccttccagc tacagatcaa tgctcctgtc cgagtgtggt agctaatga
1741 gagccacctg gacagtgggg aacagacagt ccgctgtcgt ggccggggca tgccccagcc
1801 gaacatcatc tggctctgct gcagagacct caaaagggtg ccactgagc tgcgccccac
1861 gctgctgggg aacagttccg aagaggagag ccagctggag actaacgtga cgtactggga
1921 ggaggagcag gagtttgagg tggtagcac actgctctg cagcacgtg atcggccact
1981 gtcggtgctg tgcaagctgc gcaacgtgt gggccaggac acgcaggagg tcatcgtggt
2041 gccacactcc ttgcccctta aggtggtggt gatctcagcc atcctggccc tgggtggtgct
2101 caccatcatc tcccttatca tcctcatcat gctttggcag aagaagccac gttacgagat
2161 ccgatggaag gtgattgagt ctgtgagctc tgacggccat gagtacatct acgtggaccc
2221 catgcagctg ccctatgact ccactggga gctgcccggg gaccagcttg tgetgggacg
2281 caccctcggc tctggggcct ttgggcagg ggtggaggcc acggtcatg gctgagcca
2341 ttctcaggcc acgatgaaag tggcctcaa gatgcttaa tccacagccc gcagcagtga
2401 gaagcaagcc cttatgtcgg agctgaagat catgagtcac cttgggcccc acctgaacgt
2461 ggtcaacctg ttgggggct gcaccaaagg aggacccatc tatatcatca ctgagtactg
2521 ccgctacgga gacctggtg actacctgca ccgcaacaaa cacaccttc tgcagacca
2581 ctccgacaag cgccgcccgc ccagcgcgga gctctacagc aatgctctgc ccgtgggct
2641 cccctgccc agccatgtgt cctgaccgg ggagagcgac ggtggtaca tggacatgag
2701 caaggacgag tcggtggact atgtgccat gctggacatg aaaggagacg tcaaatatgc
2761 agacatcgag tcctccaact acatggcccc ttacgataac tacgttccct ctgcccctga

```

ES 2 773 631 T3

2821 gaggacctgc cgagcaactt tgatcaacga gtctccagtg ctaagctaca tggacctcgt
 2881 gggcttcagc taccaggtgg ccaatggcat ggagtttctg gcctccaaga actgcgtcca
 2941 cagagacctg gcggctagga acgtgctcat ctgtgaaggc aagctgggtca agatctgtga
 3001 ctttgccctg gctcgagaca tcatgcggga ctcgaattac atctccaaag gcagcacctt
 3061 tttgccttta aagtggatgg ctccggagag catcttcaac agcctctaca ccaccctgag
 3121 cgacgtgtgg tccttcggga tcctgctctg ggagatcttc accttgggtg gcaccctta
 3181 cccagagctg cccatgaacg agcagttcta caatgccatc aaacgggggtt accgcatggc
 3241 ccagcctgcc catgccctcg acgagatcta tgagatcatg cagaagtgct ggggaagagaa
 3301 gtttgagatt cggccccctt tctcccagct ggtgctgctt ctcgagagac tgttgggcga
 3361 aggttacaaa aagaagtacc agcaggtgga tgaggagttt ctgaggagtg accaccagc
 3421 catccttggg tcccaggccc gcttgctggg gttccatggc ctccgatctc ccctggacac
 3481 cagctccgtc ctctatactg ccgtgcagcc caatgagggt gacaacgact atatcatccc
 3541 cctgcctgac cccaaaccgg aggttgctga cgagggccca ctggagggtt cccccagcct
 3601 agccagctcc accctgaatg aagtcaaac ctcctcaacc atctcctgtg acagccccct
 3661 ggagccccag gacgaaccag agccagagcc ccagcttgag ctccaggtgg agccggagcc
 3721 agagctggaa cagttgccgg attcgggggtg cctgctgcct cgggcggaag cagaggatag
 3781 ctctctgtag gggctggcc cctaccctgc cctgcctgaa gctccccccc gctccagacc
 3841 cagcatctcc tggcctggcc tgaccgggtt tcctgtcagc caggctgccc ttatcagctg
 3901 tccccttctg gaagctttct gctcctgacg tgttgtgccc caaacctggg ggettgctta
 3961 ggaggcaaga aaactgcagg ggcctgacc agccctctgc ctccaggag gccaactgac
 4021 tctgagccag ggttccccca ggaactcag ttttcccata tgtaagatgg gaaagttagg
 4081 cttgatgacc cagaatctag gattctctcc ctggctgaca ggtggggaga ccgaatccct
 4141 ccctgggaag attcctggag ttactgagggt ggtaaattaa ctttttctg ttcagccagc
 4201 taccctcaa ggaatcatag ctctctctcc gcaactttat ccaccagga gctagggag
 4261 agaccctagc ctccctgget gctggtctgag ctagggccta gccttgagca gtgttgcctc
 4321 atccagaaga aagccagtct cctccctatg atgccagtcc ctgcttccc tggcccagc
 4381 tggctctggg ccattaggca gcctaattaa tgctggaggc tgagccaagt acaggacacc
 4441 cccagcctgc agcccttgcc cagggcactt ggagcacacg cagccatagc aagtgcctgt
 4501 gtccctgtcc ttcaggccca tcagtctctg ggtttttctt ttatcacctc cagtcttaat
 4561 ccatccacca gactctagaa ggccagacgg gccccgcac tgatgatgaga atgtaaatgt
 4621 gccagtgtgg agtggccacg tgtgtgtgccc agtatatggc cctggctctg cattggacct
 4681 gctatgaggc tttggaggaa tcctcacc cctctggggc tcagtttccc cttcaaaaaa
 4741 tgaataagtc ggacttatta actctgagtg ccttgccagc actaacatc tagagtatc
 4801 caggtggttg cacatttgct cagatgaagc aaggccatat accctaaact tccatcctgg
 4861 ggtcagctg ggctcctggg agattccaga tcacacatca cactctgggg actcaggaac
 4921 catgccccct ccccaggccc ccagcaagtc tcaagaacac agctgcacag gccttgactt
 4981 agagtgacag ccggtgtcct ggaaagcccc cagcagctgc cccagggaca tgggaagacc
 5041 acgggacctc tttcactacc cacgatgacc tccgggggta tcctgggcaa aagggacaaa
 5101 gagggcaaat gagatcacct cctgcagccc accactccag cacctgtgcc gaggtctgcy
 5161 tcgaagacag aatggacagt gaggacagtt atgtcttgta aaagacaaga agcttcagat
 5221 gggtagccca agaaggatgt gagaggtggg cgctttggag gtttgcccct caccaccag
 5281 ctgccccatc cctgaggcag cgctccatgg gggatgggtt ttgtcactgc ccagacctag
 5341 cagtgcacac tcattgtccc cagcccagtg ggcattggag gtgcccagggt agtcagggtt
 5401 gtagccaaga ccccccgca cggggagggt tgggaagggt gtgcaggaag ctcaaccct
 5461 ctgggcaacca accctgcatt gcaggttggc accttacttc cctgggatoc ccagagtgg
 5521 tccaaggagg gagagtgggt tctcaatacg gtaccaaga tataatcacc taggtttaca
 5581 aatattttta ggactcacgt taactcacat ttatacagca gaaatgctat tttgtatgct
 5641 gttaagtttt tctatctgtg tacttttttt taagggaag attttaatat taaacctggt
 5701 gcttctcact cacaaaaa

SEQ ID NO.: 4 (Secuencia de aminoácidos de PDGFRb humano)

MRLPGAMPALALKGELLLLLSLLLLLLEPQISQGLVVTTPGPELVL

NVSSTFVLTCSGSAPVWVERMSQEPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTEYFCTH

5

NDSRGLTDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITI PCRVTDPQLVVTL

ES 2 773 631 T3

HEKKG DVALPVPYDHQRGFSGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINVS
NAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWYPRKESGRLVEPVTDFFLLDMPYHIRSIL
HIPSAELEDSTYTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRLLEGEVGTLQFAELHRSR
TLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSELT LVRVKVAEAG
HYTMRAFHEDAEVQLSFQLQINVPVRVLELSESHPDSTVRCRGRGMPQPNI IWSA
CRDLKRCPRELPPTLLGNSSEEEESQLETNVTYWEEEQEFVVSTLRLQHVD RPLSVRC
TLRNAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPRYEIRW
KVIESVSSDGHEYIYVDPMLPYDSTWELPRDQLVLGRTLGSAGFGQVVEATAHGLSH
SQATMKVAVKMLKSTARSSKQALMSELKIMSHLGPLN VVNLGACTKGGPIYIITE
YCRYGDLVDYLHRNKHTFLQHHSKRRPPSAELYSNALPVGLPLPSHVSLTGESDGGY
MDMSKDESVDYVPMLDMKGDVKYADIESSNYMAPYDNYVPSAPERTCRATLINESPVL
SYMDLVGFSYQVANGMEFLASKNCVHRDLAARNVLIC EGKLVKICDFGLARDIMRDSN
YISKGSTFLPLKWMAPESIFNSLYTTLSDVWSFGILLWEIFTLGGTPYPELPMNEQFY
NAIKRGYRMAQPAHASDEIYEIMQKCWEEKFEIRPPFSQLVLLLERLLGEGYKKKYQQ
VDEEFLRSDHPAILRSQARLPGFHGLRSPLDTSSVLYTAVQPNEGDN DYIIPLPDPKP
EVADEGPLEGSPSLASSTLNEVNTSSTISCDSPLEPQDEPEPEPQLELQVEPEPELEQ
LPDSGCPAPRAEAEDSFL

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente terapéutico que inhibe un receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR β) para usar en un método de tratamiento o prevención de metástasis tumoral, en un sujeto que tiene una ganancia de función de la mutación p53 que aumenta sus propiedades oncogénicas en relación con el tipo silvestre, en el que el tumor es un tumor de cáncer de páncreas, un tumor de cáncer colorrectal o un tumor de cáncer de ovario.
- 10 2. El agente terapéutico para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente terapéutico reduce la expresión o actividad del PDGFR β .
- 15 3. Un agente terapéutico que reduce la expresión o actividad de un PDGFR β , para usar en un método de tratamiento de un sujeto que tiene un tumor que comprende una ganancia de función de la mutación p53, en el que el tumor es un tumor de cáncer de páncreas, un tumor de cáncer colorrectal o un tumor de cáncer de ovario
- 20 4. El agente terapéutico para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el agente terapéutico reduce la metástasis tumoral.
- 25 5. El agente terapéutico para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el agente terapéutico es un anticuerpo, un ácido nucleico o una molécula pequeña.
- 30 6. El agente terapéutico para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el agente terapéutico es imatinib.
- 35 7. El agente terapéutico para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el agente terapéutico es un ácido nucleico que se une a la SEQ ID NO: 3 o una porción de la misma.
- 40 8. El agente terapéutico para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el agente terapéutico es un anticuerpo que se une a la SEQ ID NO: 4 o una porción de la misma.
- 45 9. El agente terapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además detectar una ganancia de función de la mutación p53 en el tumor.
10. El agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la ganancia de función de la mutación p53 se detecta en una muestra del tumor.
11. El agente terapéutico para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la ganancia de función de la mutación p53 se detecta en el tumor *in vivo*.
12. Un método para identificar a un sujeto para el tratamiento con un agente terapéutico que se dirige a un PDGFR β , comprendiendo el método:
detectar en una muestra del sujeto un tumor que comprende una ganancia de función de la mutación p53; y
seleccionar el sujeto para el tratamiento con un agente terapéutico que se dirige a un PDGFR β , en el que el tumor es un tumor de cáncer de páncreas, un tumor de cáncer colorrectal o un tumor de cáncer de ovario.
13. El agente terapéutico para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que las propiedades oncogénicas incluyen proliferación de células tumorales, supervivencia de células tumorales e invasión y metástasis de células tumorales.

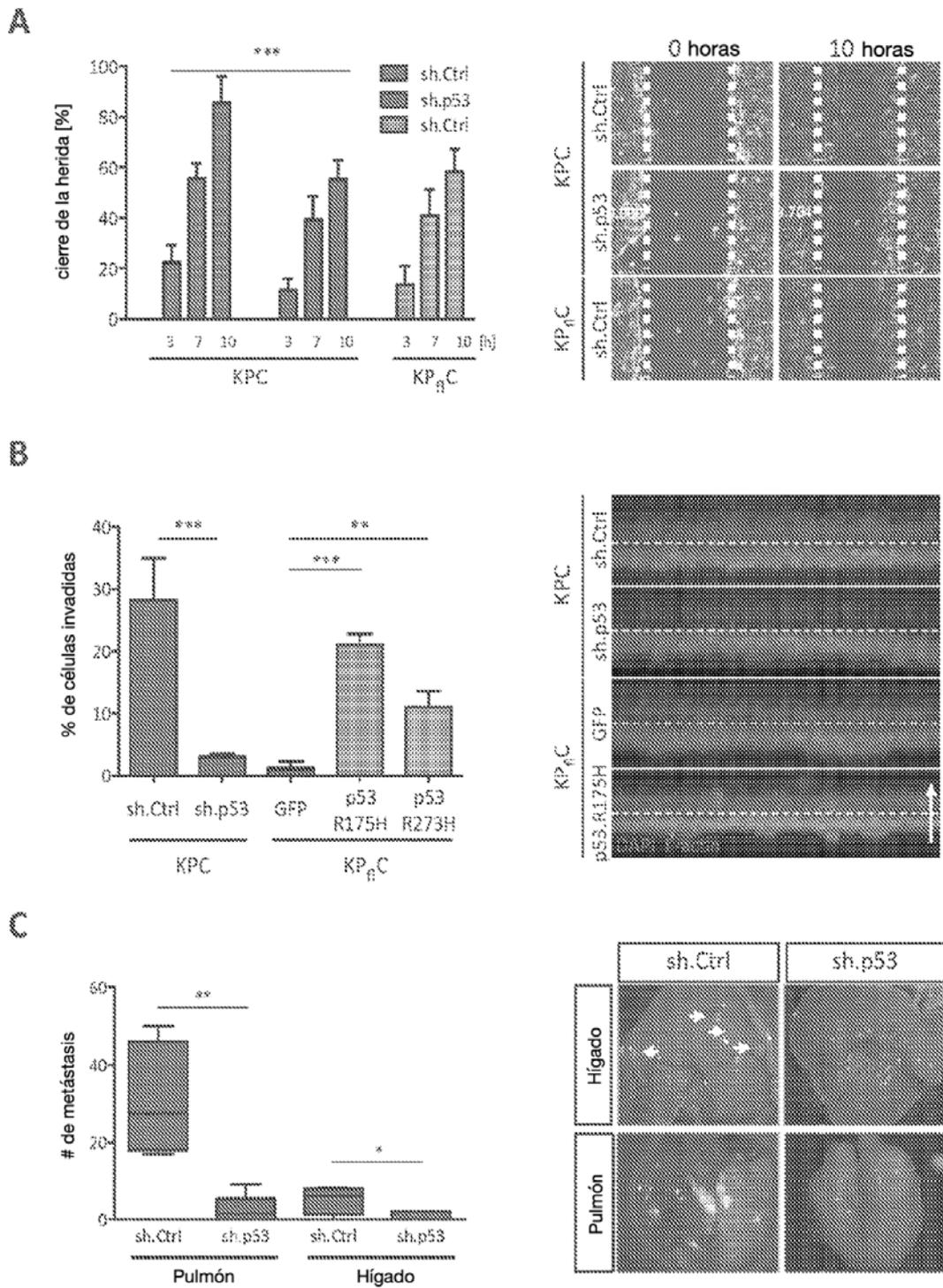


FIGURA 1

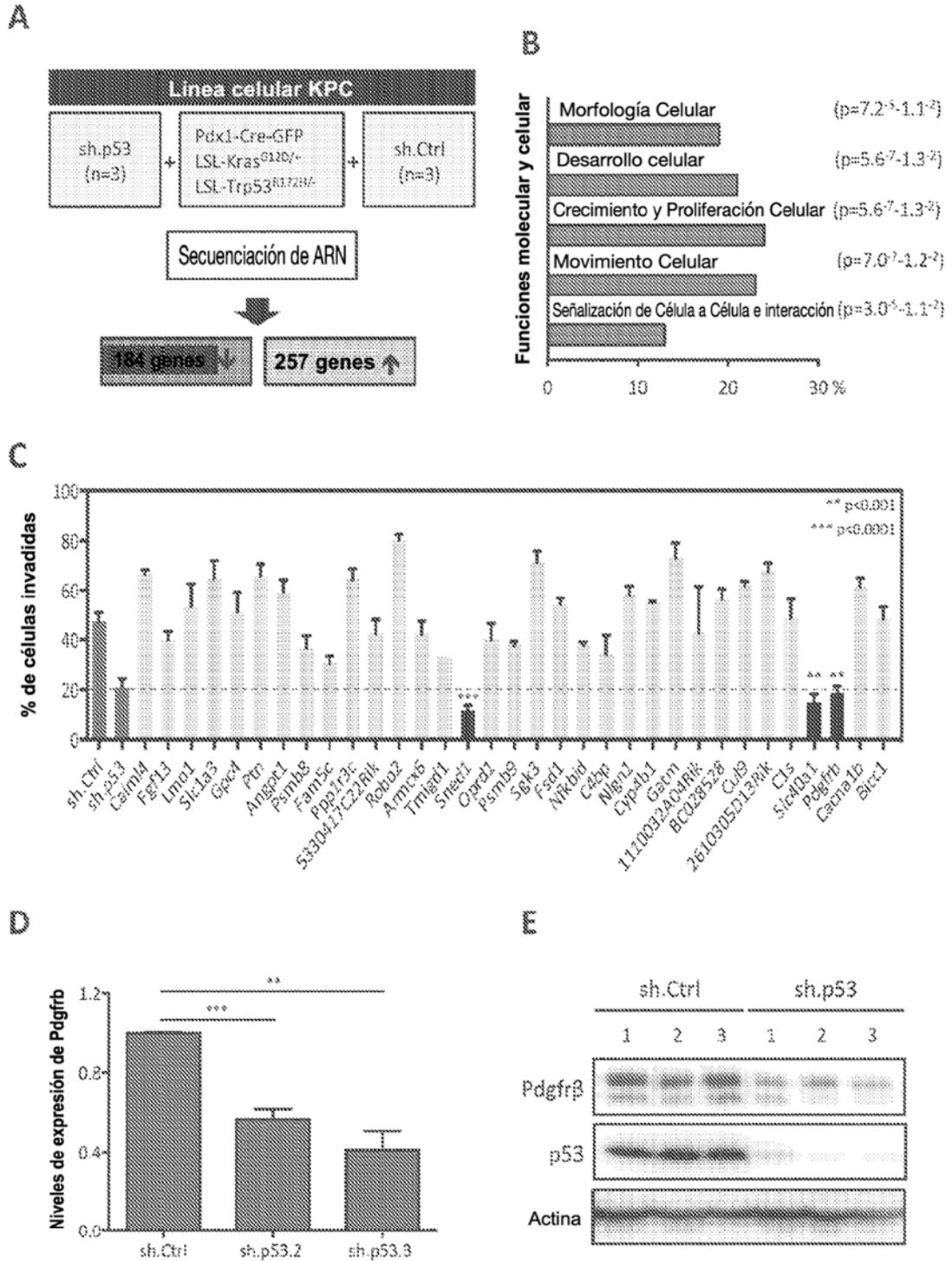


FIGURA 2

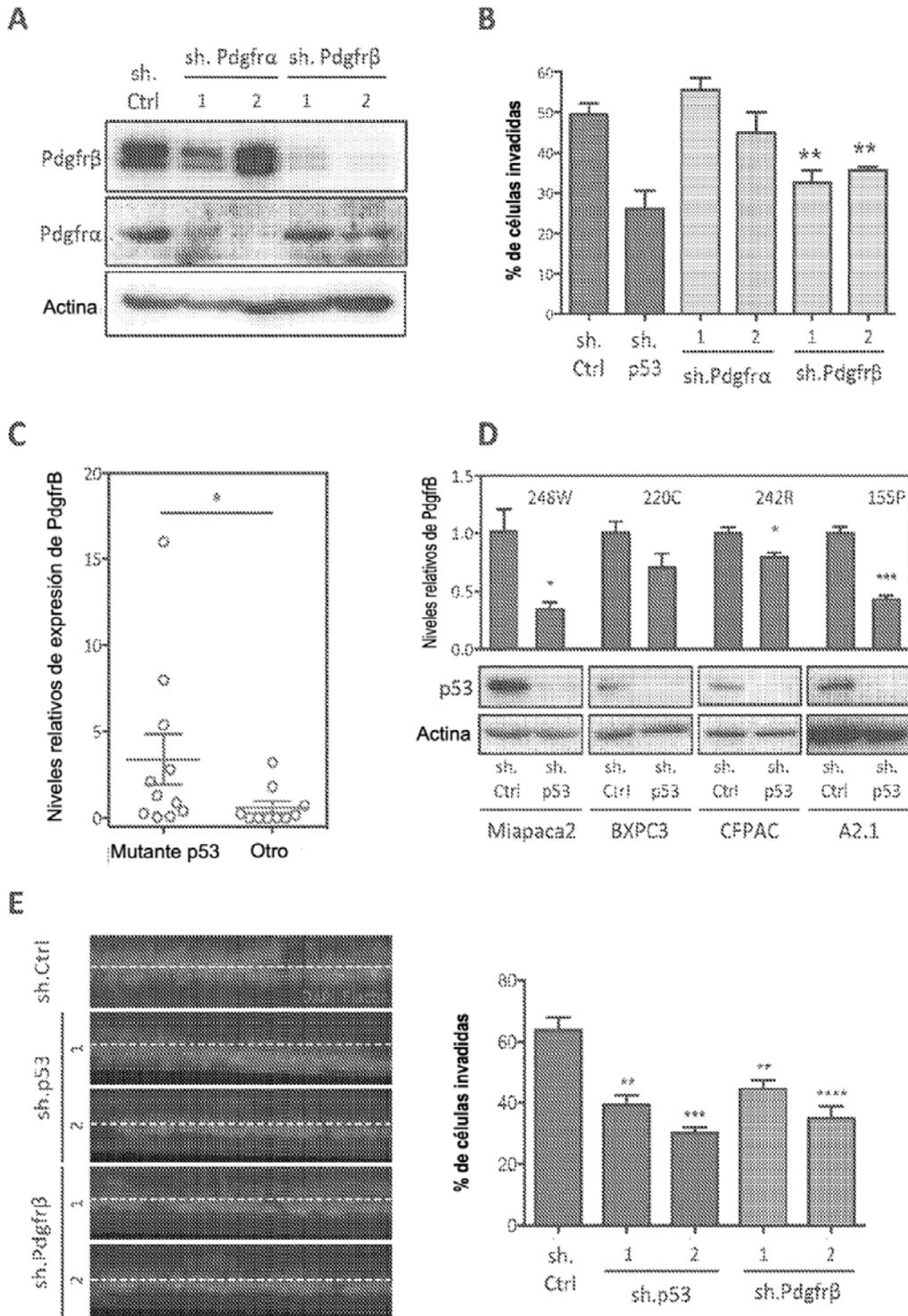


FIGURA 3

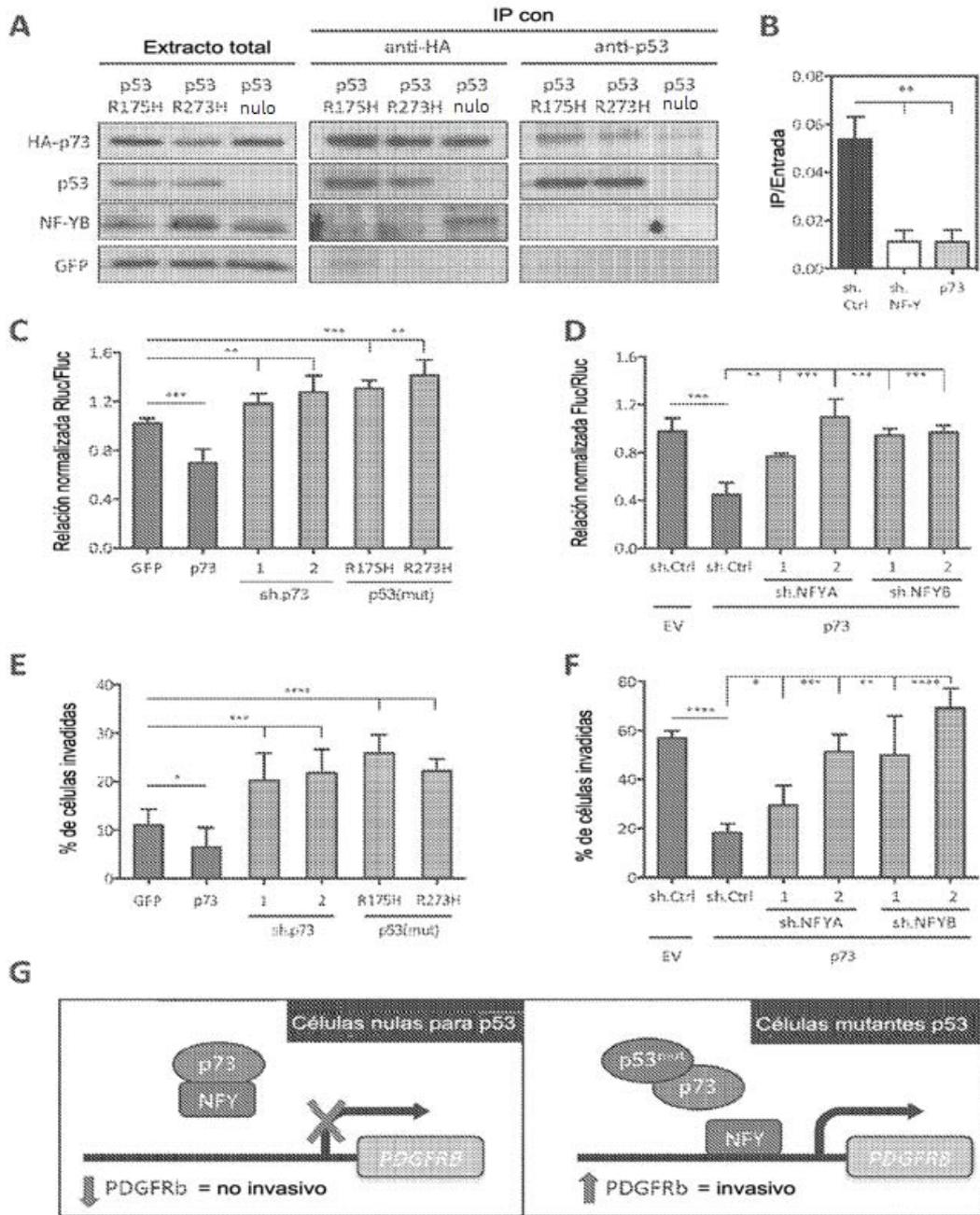


FIGURA 4

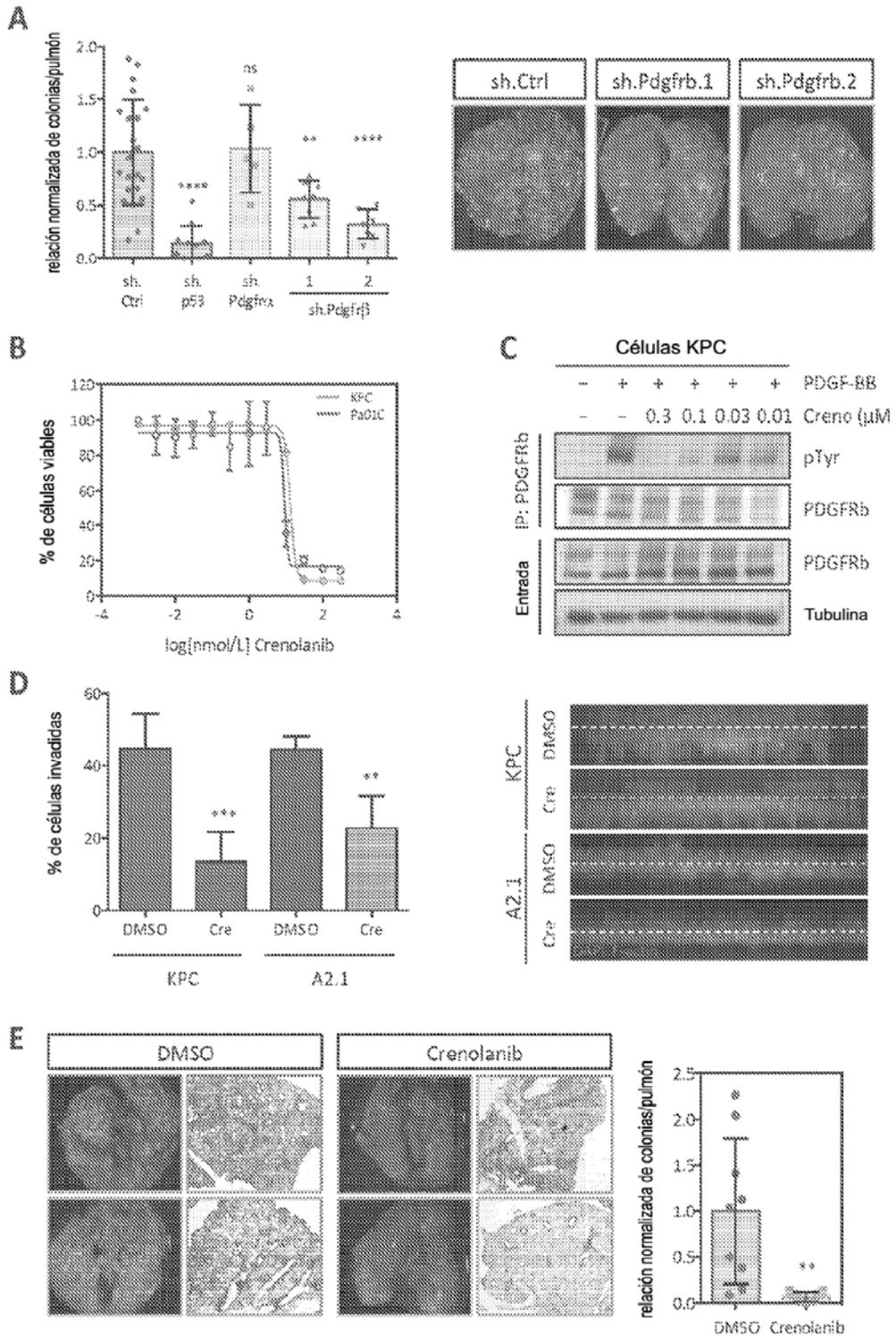


FIGURA 5

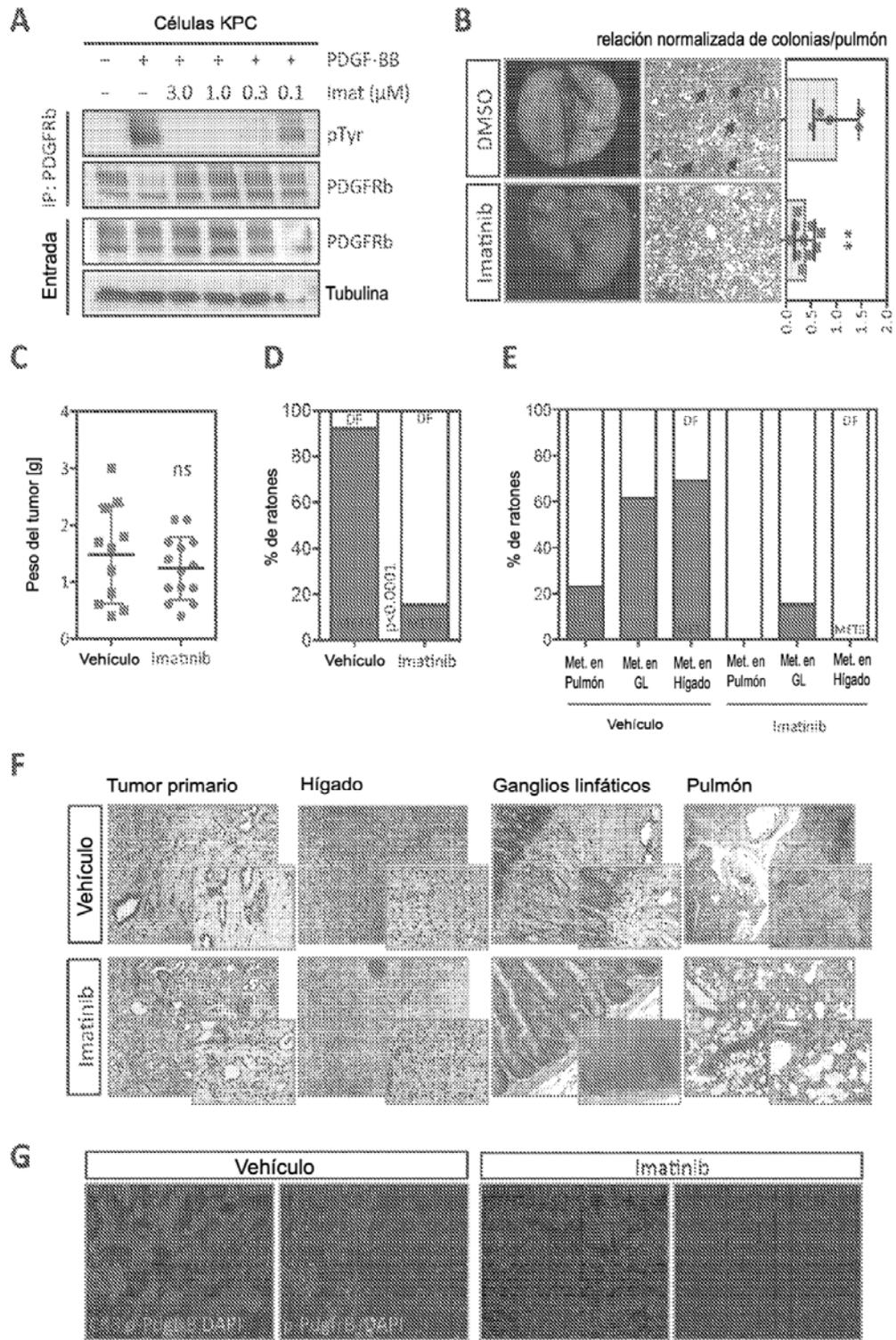


FIGURA 6

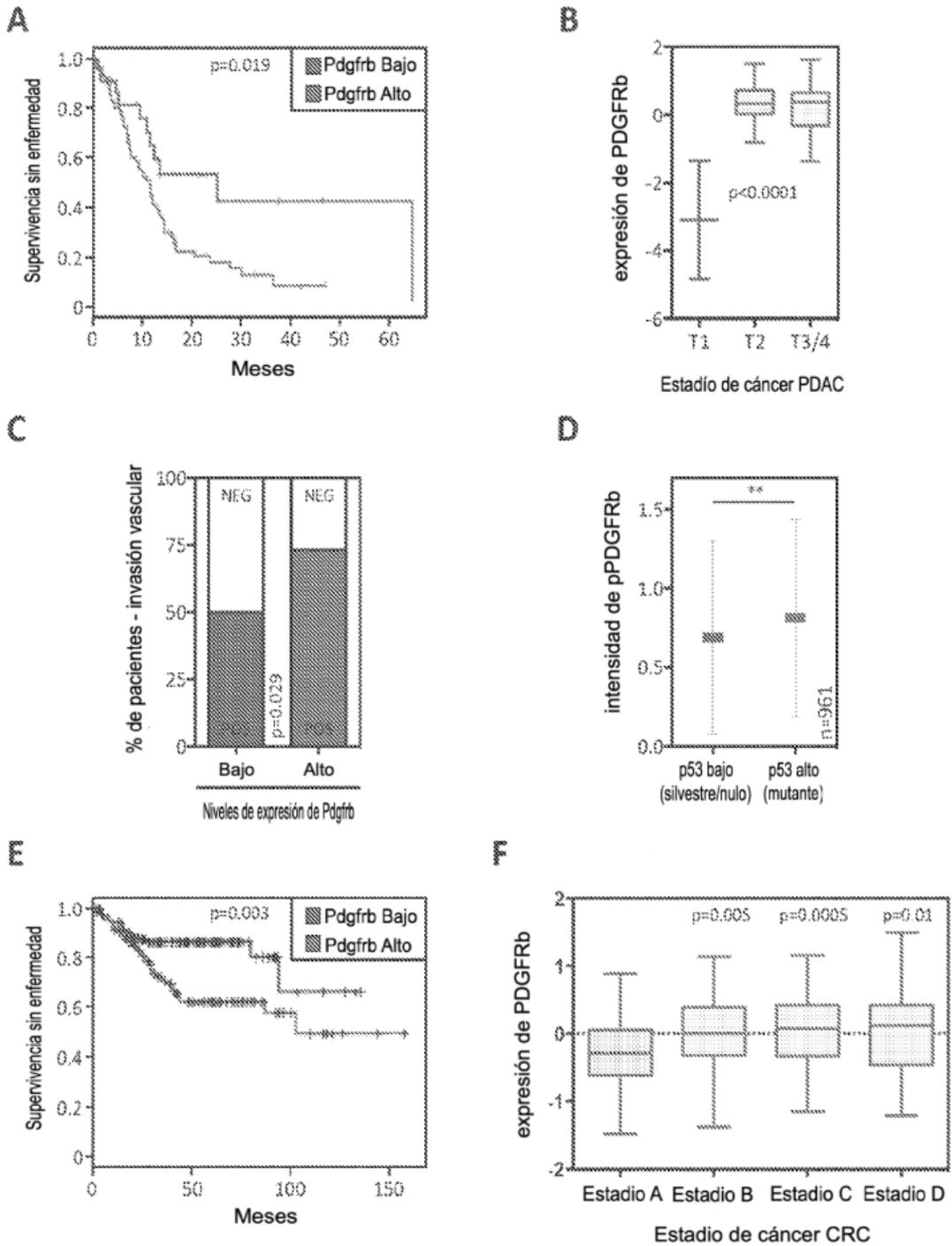


FIGURA 7

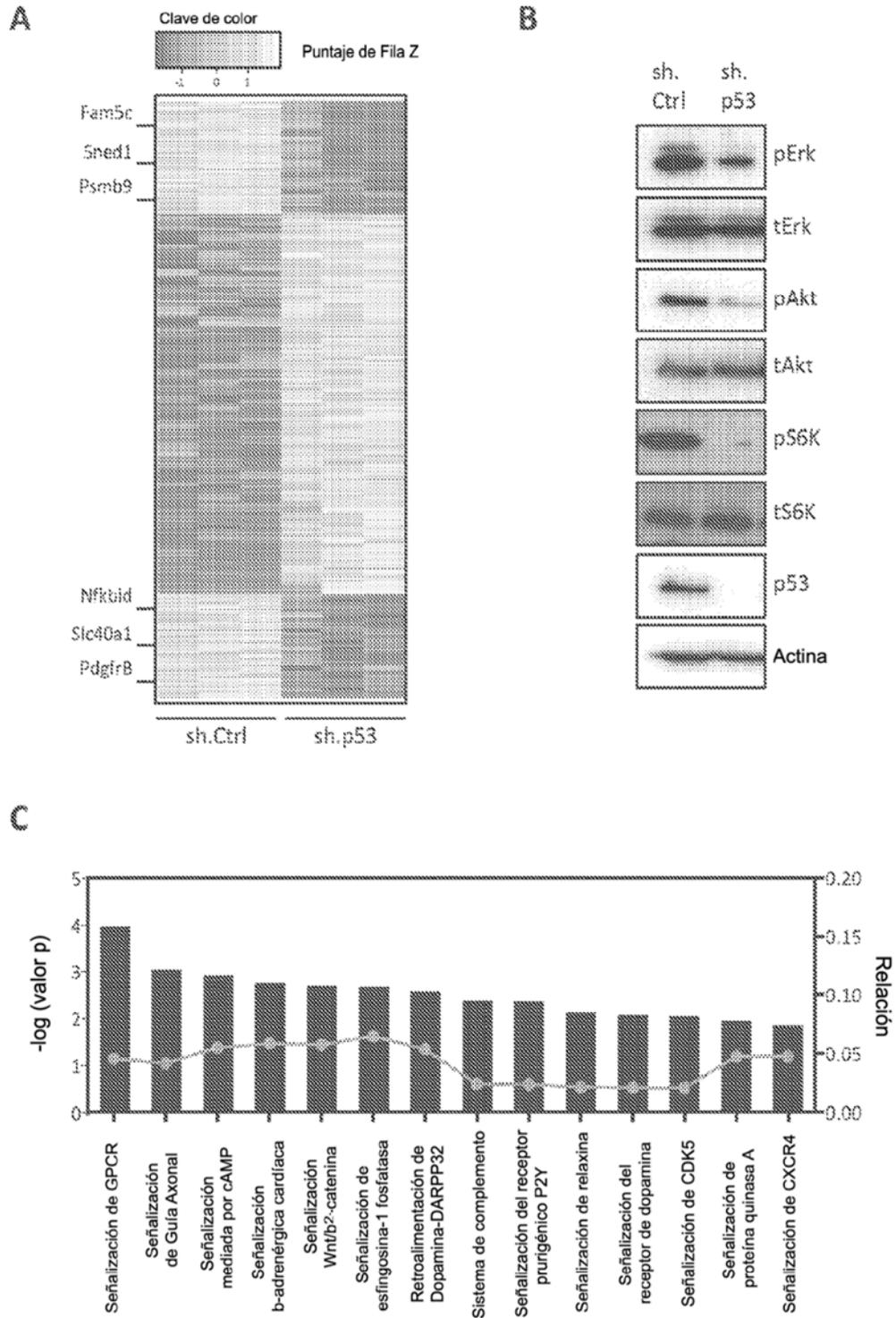


FIGURA 8

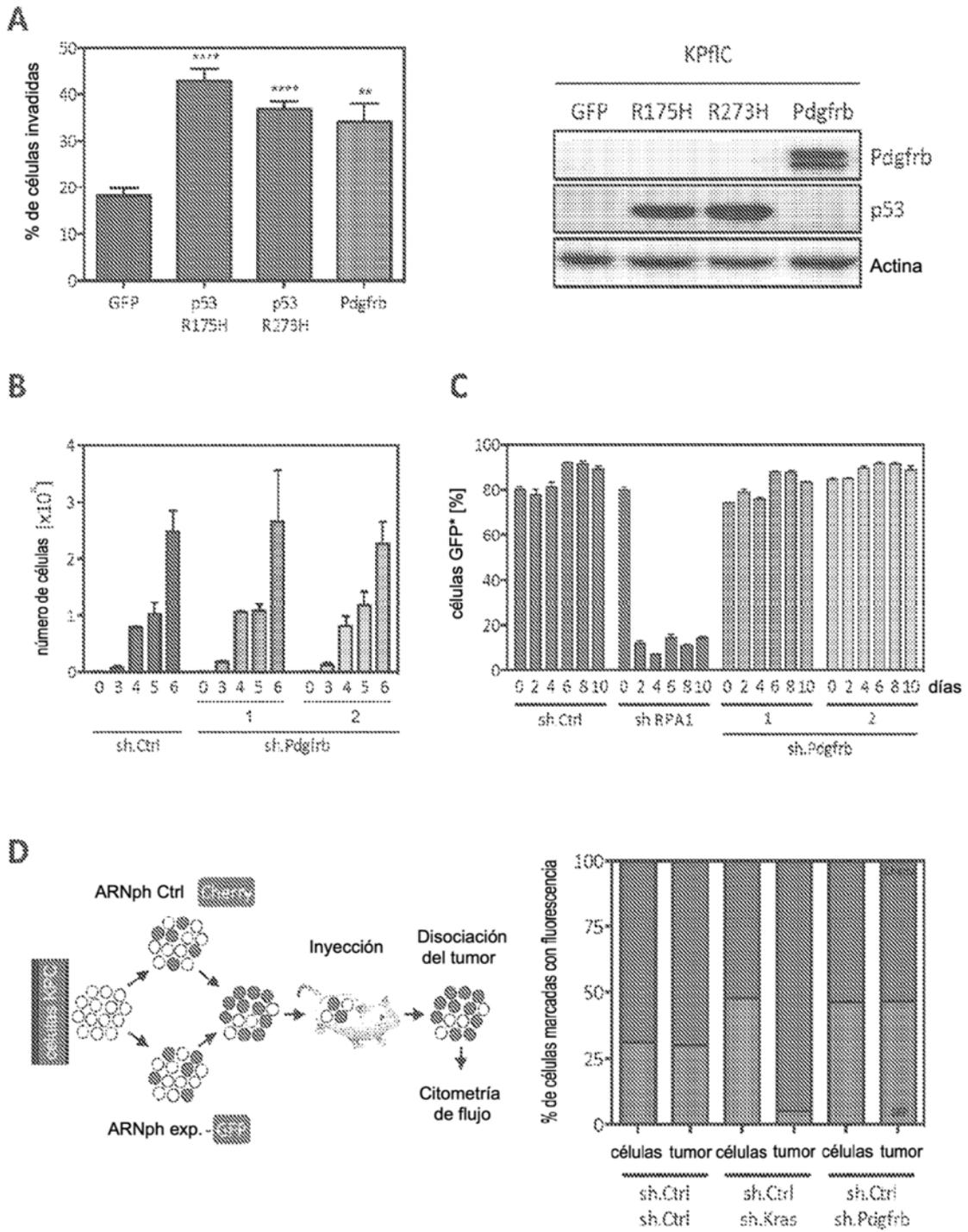


FIGURA 9

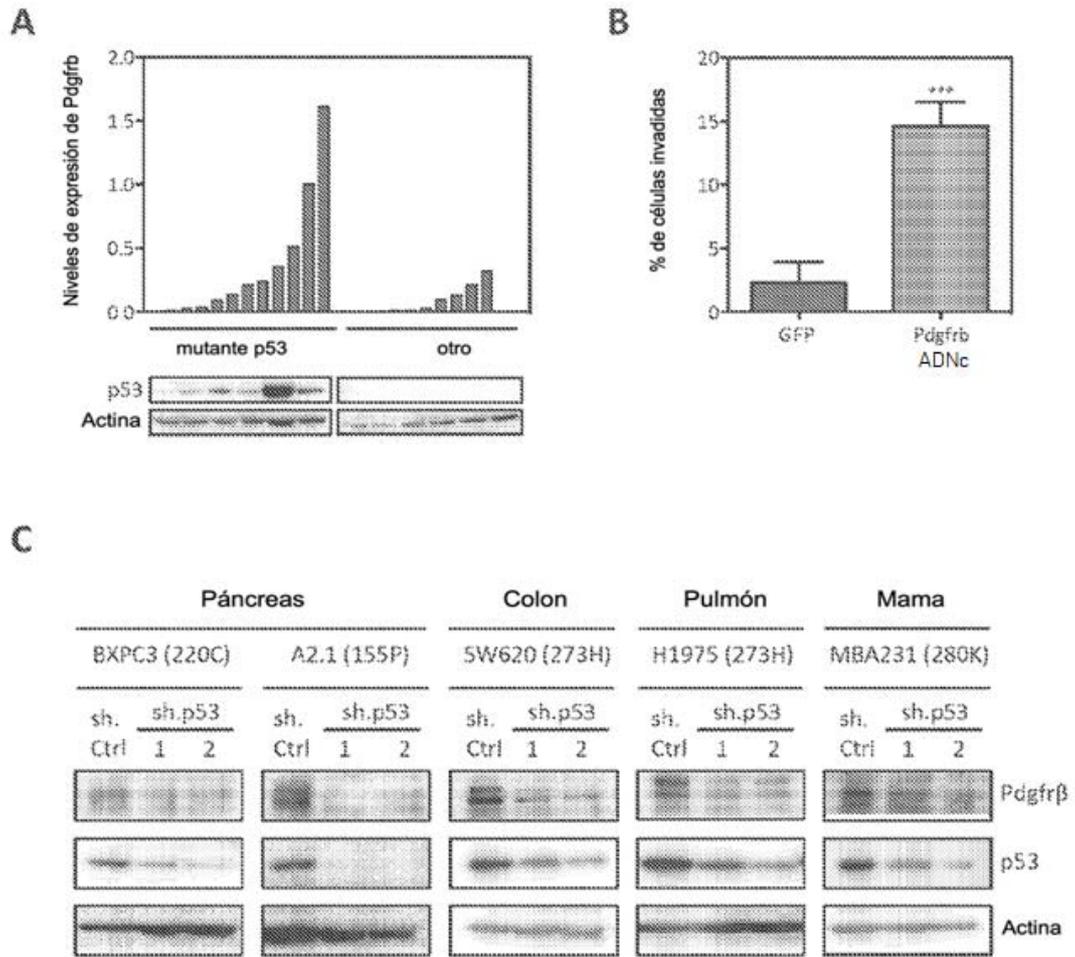


FIGURA 10

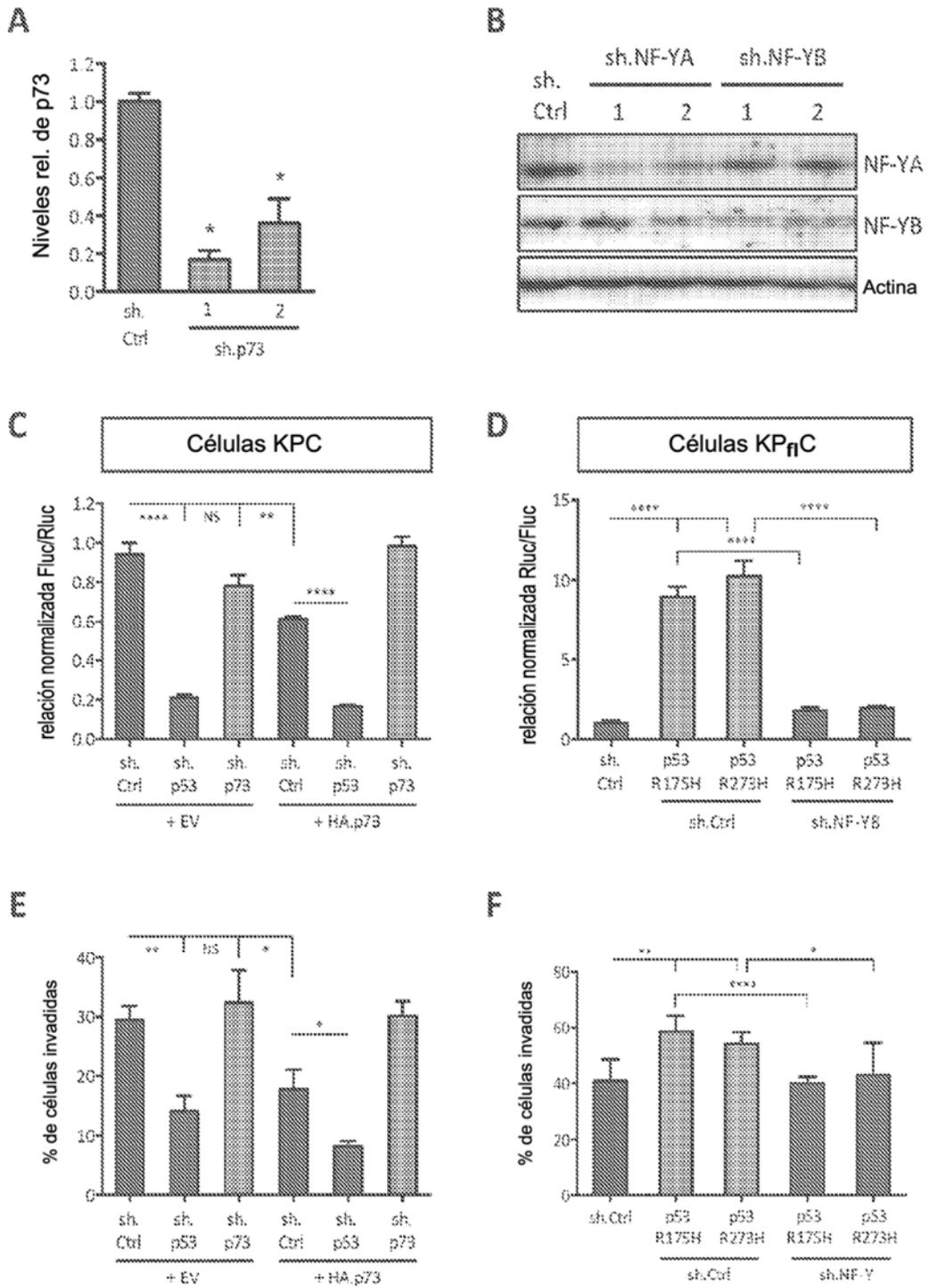


FIGURA 11

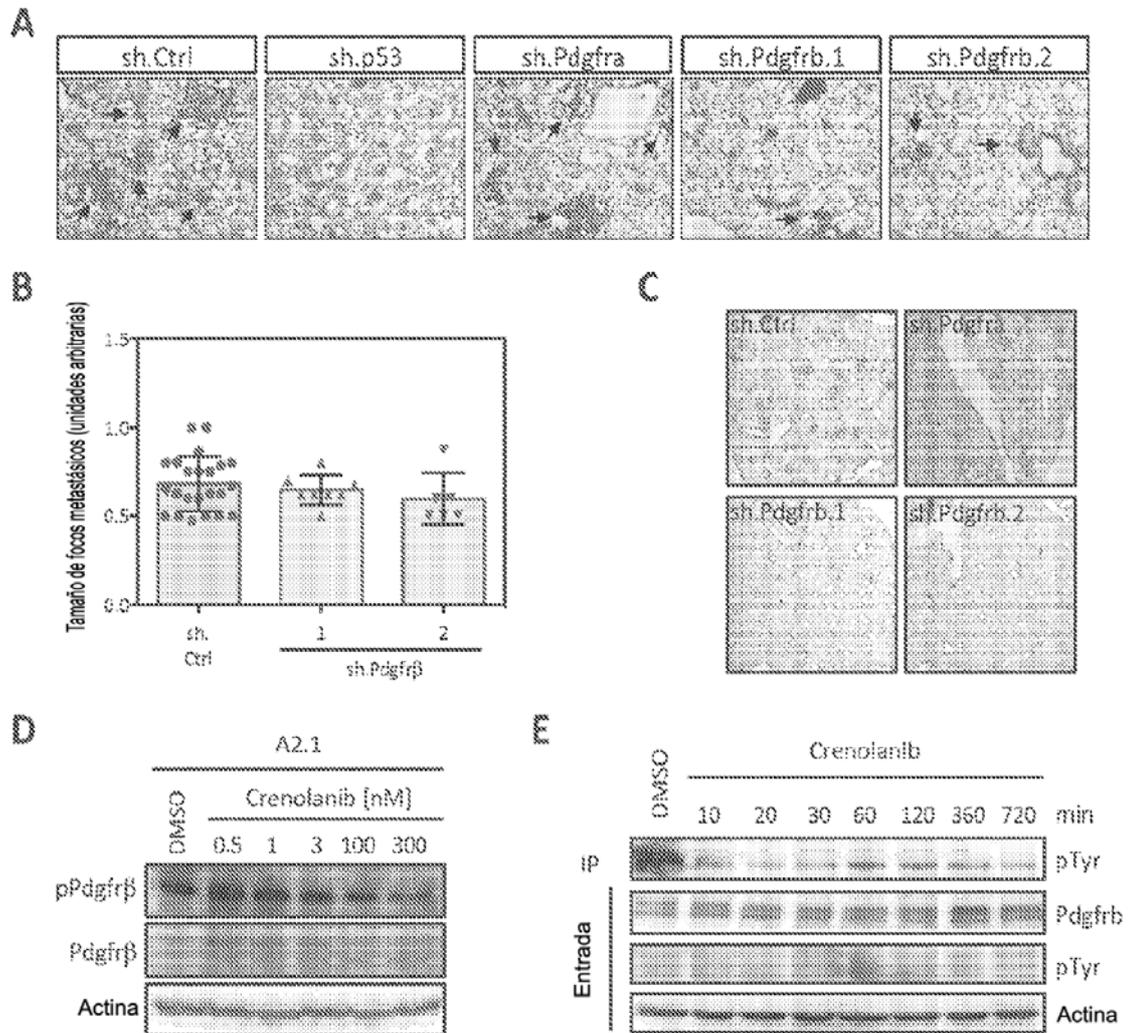


FIGURA 12

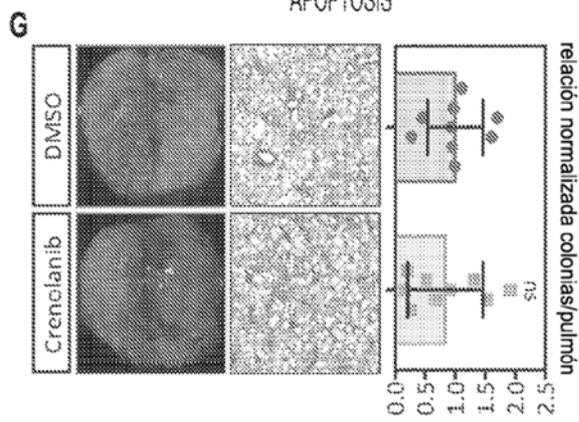
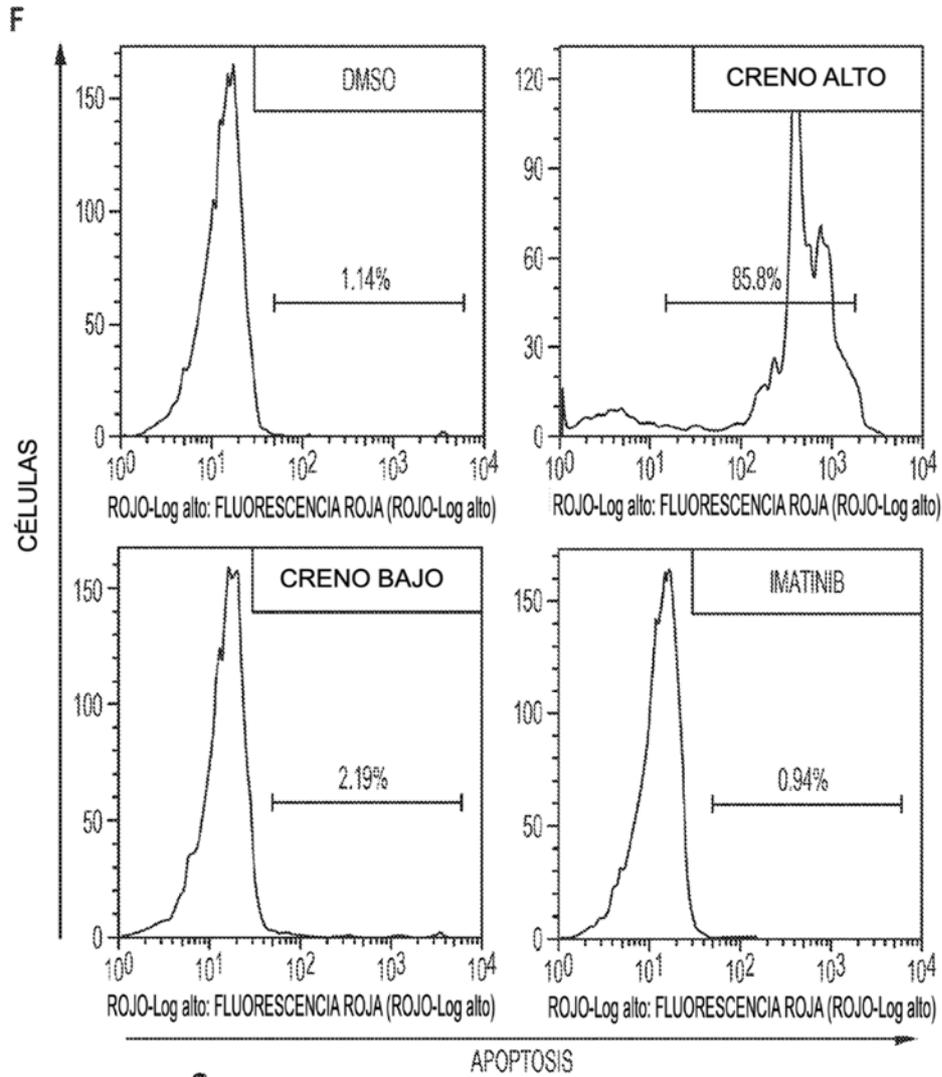


FIGURA 12
CONTINUACIÓN

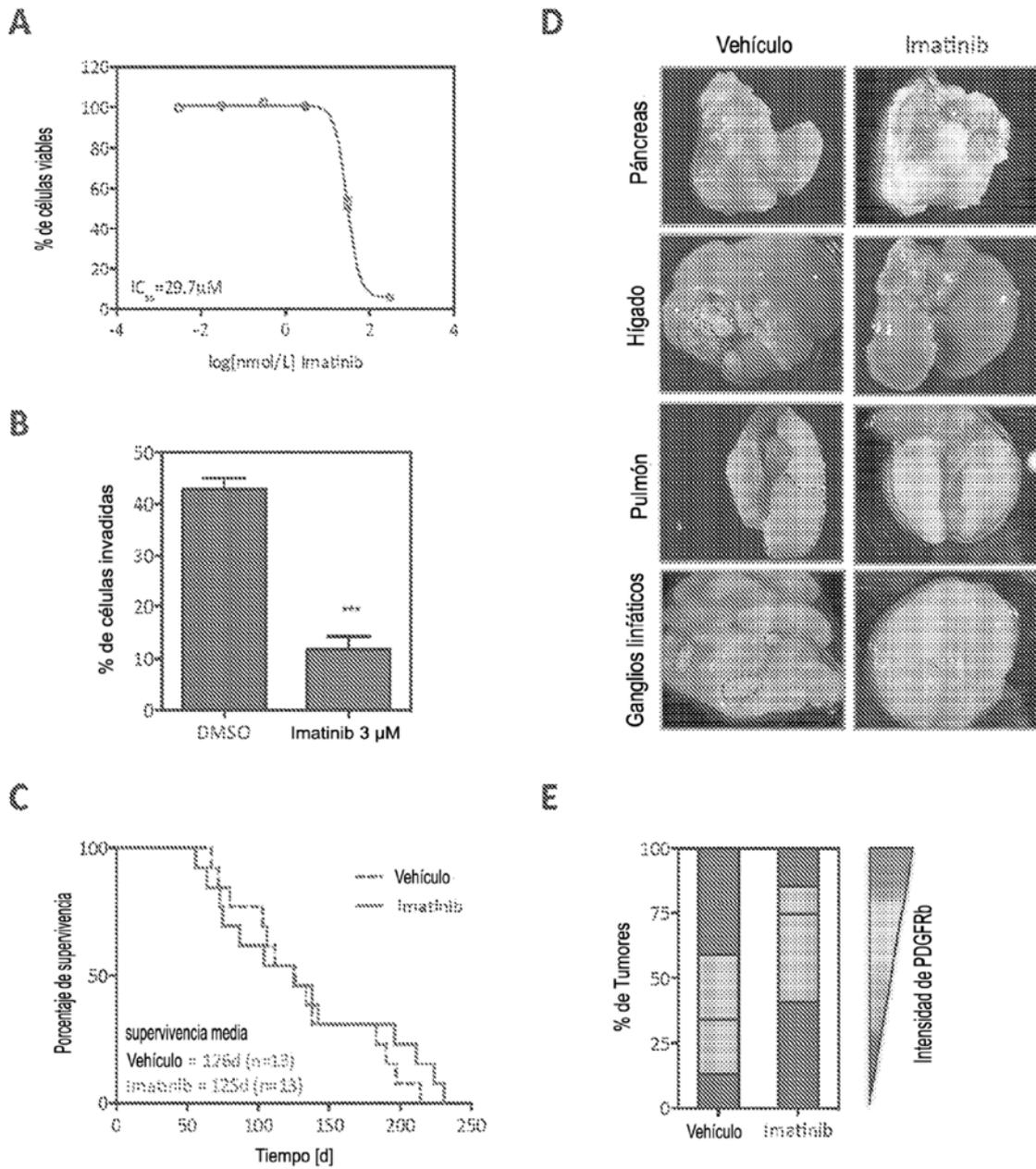


FIGURA 13

A

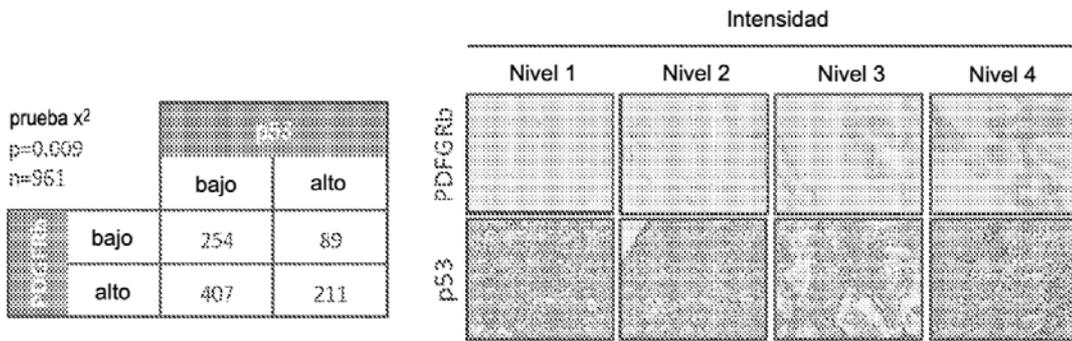


FIGURA 14

B

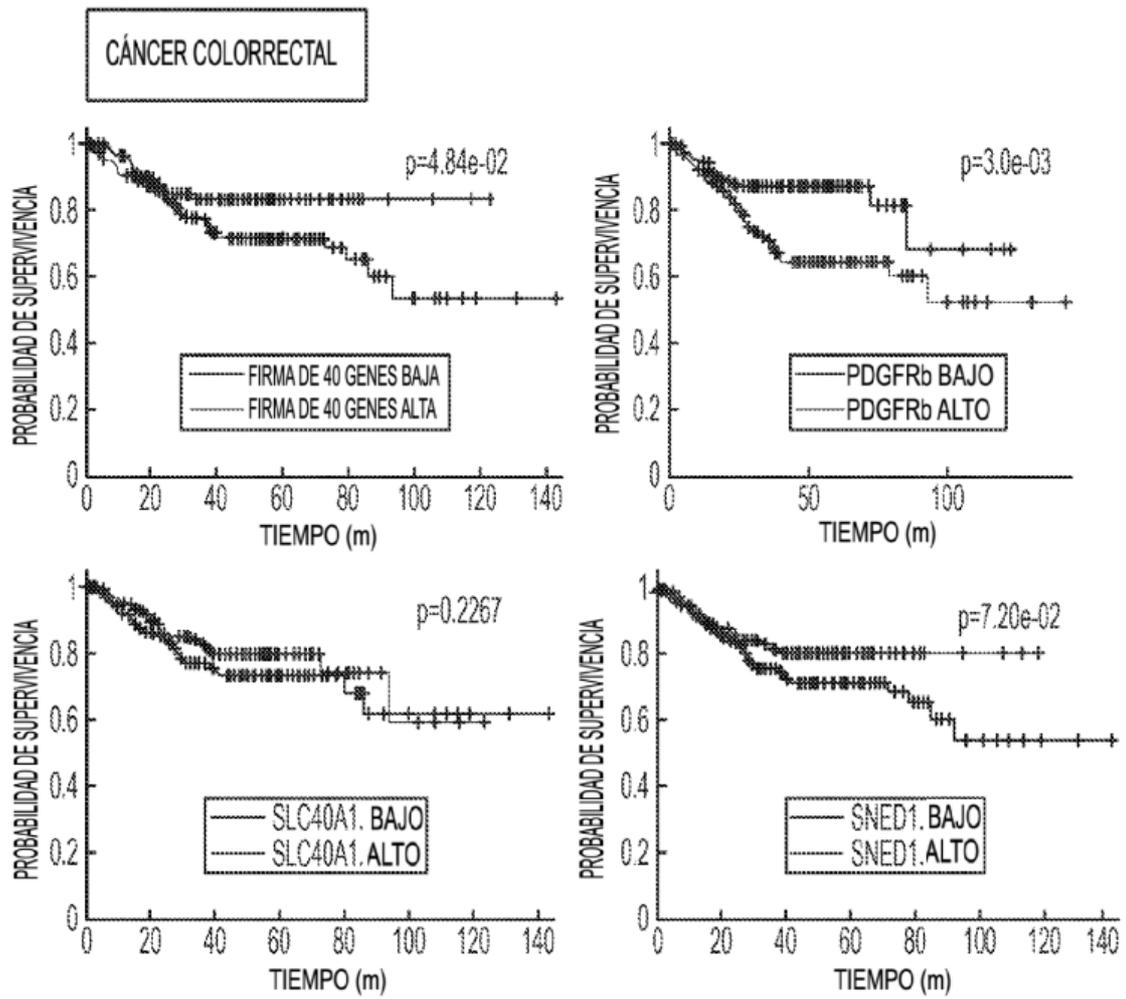


FIGURA 14
CONTINUACIÓN

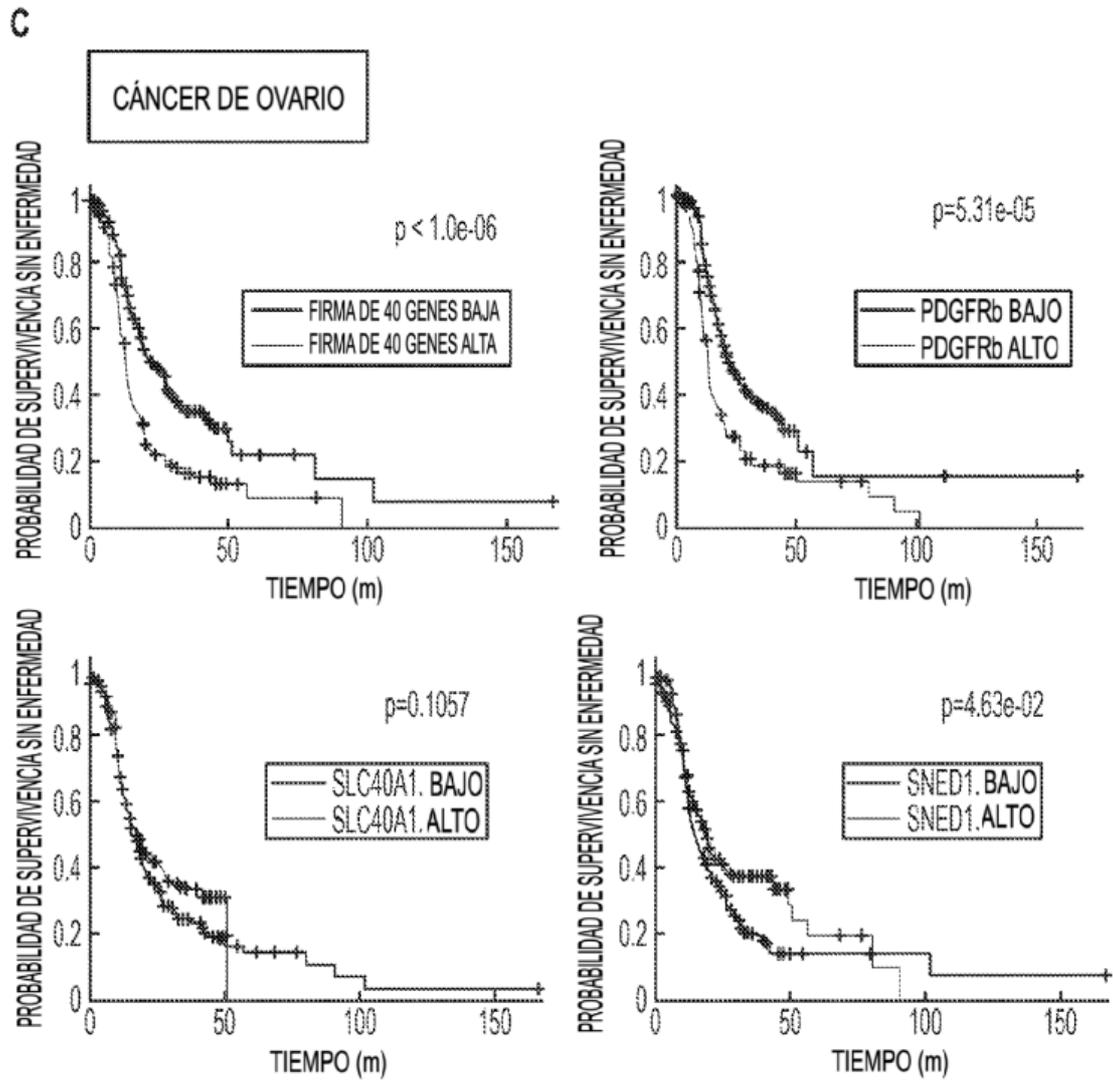


FIGURA 14
CONTINUACIÓN