

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 003**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2014 PCT/US2014/034399**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014 WO14172479**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2014 E 14785765 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2986740**

54 Título: **Compañero de diagnóstico para inhibidores de CDK4**

30 Prioridad:

16.04.2013 US 201361812412 P
21.10.2013 US 201361893755 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.09.2020

73 Titular/es:

MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER (100.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10021, US

72 Inventor/es:

KOFF, ANDREW, W.;
CRAGO, AIMEE;
LIU, DAVID;
KOVATCHEVA, MARTA;
SINGER, SAMUEL;
SCHWARTZ, GARY, K.;
DICKSON, MARK, A. y
KLEIN, MARY, ELIZABETH

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 782 003 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

Compañero de diagnóstico para inhibidores de CDK4

1. Introducción

5 La presente invención se refiere a biomarcadores que pueden usarse para evaluar la probabilidad de que un inhibidor de CDK4 produzca un efecto anticancerígeno en un sujeto. Como tal, estos biomarcadores pueden usarse en métodos de tratamiento de pacientes con cáncer.

2. Antecedentes de la invención

10 El homólogo doble diminuto murino 2 (MDM2) es una proteína que está codificada por el gen *MDM2*. MDM2 funciona como una ubiquitina ligasa E3 y como regulador negativo de la proteína supresora tumoral, p53, mediante ubiquitinación y selección como diana de p53 para su degradación (8). MDM2 afecta el ciclo celular, la apoptosis y la tumorigénesis a través de la interacción con otras proteínas, incluyendo el retinoblastoma (RB) (50).

15 Los estudios de asociación de todo el genoma, tales como los proyectos del Atlas del Genoma del Cáncer, muestran que la mayoría de los cánceres son genéticamente heterogéneos. Algunas alteraciones/mutaciones recurrentes son parte integral del desarrollo y la progresión de un tumor, mientras que una gran cantidad de otros cambios pueden alterar sustancialmente su fenotipo, afectando a la progresión y teniendo un impacto tanto sobre el pronóstico del paciente como sobre la eficacia de la terapia (1-5). El noventa por ciento de los liposarcomas bien diferenciados y dediferenciados (WD/DDLS, por sus siglas en inglés) tienen amplificación de genes en el segmento cromosómico 12q13-15, en un contexto de cariotipos que son ampliamente variables y, en muchos casos, altamente complejos. La amplificación de 12q13-15 se asocia con la sobreexpresión de los oncogenes MDM2 y CDK4, y se cree que las proteínas traducidas correspondientes fomentan la liposarcomagénesis (6).

20 CDK4 fomenta la proliferación celular catalizando la fosforilación y la inactivación del RB (7), y MDM2 suprime la senescencia o apoptosis inducida por oncogén al inactivar p53 (8). Se han desarrollado fármacos que se seleccionan como diana específicamente estos posibles controladores y el efecto de estos agentes seleccionados como diana en pacientes con una variedad de tumores ha sido un área activa de investigación. Sin embargo, predecir la eficacia de estos fármacos sobre el desenlace de pacientes ha sido problemático, debido a la extensa interferencia molecular entre las rutas de p53 y RB y la heterogeneidad genómica de los tumores examinados (9, 10).

25 Da David, 2013. ProQuest Dissertation describe PD0332991 (un inhibidor de CDK4) y su uso para tratar el liposarcoma y menciona que los inhibidores de CDK4 pueden reducir la fosforilación de la proteína del retinoblastoma y que la respuesta a los inhibidores de CDK4 se asocia con la regulación por disminución de MDM2 y Dickson *et al*, 2013. J Clin Oncol, 31 (16), 2024-2028 describen un inhibidor de CDK4 (PD0332991) y su uso en el tratamiento de liposarcoma.

Richard *et al*, 2009. Breast Can Res, 11 (5), R77 describen un inhibidor de CDK4 (PD0332991) y su uso en el tratamiento de cáncer de mama.

35 El documento EP1309621 describe anticuerpos anti-MDM2 y anticuerpos anti-pRB y su uso para medir estos biomarcadores.

3. Sumario de la invención

40 La presente descripción se refiere a métodos y composiciones que proporcionan un compañero de diagnóstico para los inhibidores de CDK4, y en particular, al uso de la expresión de MDM2 como biomarcador para la probabilidad de que un cáncer pueda tratarse con éxito mediante la inhibición de CDK4. Se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que el tratamiento con un inhibidor de CDK4 es más eficaz cuando las células cancerosas tratadas experimentan senescencia celular en lugar de una detención transitoria del ciclo celular, en el que la senescencia celular se asocia con un nivel disminuido de proteína MDM2.

4. Breve descripción de las figuras

45 FIGURAS 1A-C. PD0332991 induce la detención del crecimiento. Las células crecieron en presencia (blanco) o ausencia (negro) de PD0332991 durante 48 horas y marcadas con BrdU, un marcador de replicación de ADN en curso (A), o anexina V y 7-AAD, un marcador de apoptosis (B). Se calculó el porcentaje medio de incorporación de BrdU o células anexina V+/7-AAD- a partir de tres o más experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar (*p<0,05). (C) Se detectó la cantidad de serina 780 fosforilada o Rb total mediante inmunotransferencia en extractos de células en crecimiento asincrónico (0) y células tratadas con PD0332991 durante 1 ó 2 días (experimento representativo; n>3 para cada línea celular).

50 FIGURAS 2A-D. PD0332991 induce senescencia en algunas células. Se hicieron crecer células en presencia (blanco) o ausencia (negro) de PD0332991 durante 7 días. Porcentaje medio (± desviación estándar). (*p<0,05). (A) Se cuantificó la tinción con α -galactosidasa asociada a senescencia y (B) con HP1 α para la formación de focos

- heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF) para tres o más experimentos independientes para cada línea celular. (*p<0,05). Se muestran micrografías de contraste de fase representativas de células teñidas para SA- β -gal o tinción de inmunofluorescencia para HP1 β en dos de las líneas celulares antes (ctrl) y después (PD) del tratamiento farmacológico en las inserciones de las figuras 2A y 2B, respectivamente. (C) Incorporación de BrdU. Se trataron las líneas celulares con PD0332991 durante siete días y se liberaron en medio libre de fármaco que contenía BrdU durante el número de días indicado. Las barras de error representan la desviación estándar de la media calculada a partir de tres ensayos independientes. (D) Se detectó la cantidad de ciclina A, p53, p16 y Arf mediante inmunotransferencia de extractos de preparados a partir de células en crecimiento asincrónico (-) y células tratadas con PD0332991 (+) durante 7 días (n>3).
- 5
- 10 FIGURAS 3A-D. El silenciamiento de CDK4 imita el efecto de PD0332991. Tras la infección lentiviral, se seleccionaron células con silenciamiento de CDK4 (shCDK4) y células infectadas con un ARNhp de control de reordenamiento (shSCR) durante diez días en puromicina. (A) Inmunotransferencia. Se resolvieron extractos de células que expresaban ARNhp dirigido contra CDK4 (+) y el control de reordenamiento (-) mediante SDS-PAGE y se midió el nivel de las proteínas indicadas mediante inmunotransferencia. (B) Incorporación de BrdU. Se marcaron con BrdU células infectadas con vectores que expresan ARNhp reordenados (negro) o de CDK4 (blanco) durante 2 horas. Se calculó el porcentaje medio de incorporación de BrdU a partir de tres o más ensayos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. (*p<0,05). (C) Se calculó la tinción con β -galactosidasa asociada a senescencia y (D) con HP1 β para la formación de focos heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF) para las células infectadas con ARNhp reordenados (negro) y de CDK4 (blanco). Se determinaron la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. (*p<0,05)
- 15
- 20 FIGURAS 4A-E. El silenciamiento de MDM2 induce senescencia en todas las líneas celulares de liposarcoma. Se transdujeron las células indicadas con dos vectores lentivirales de silenciamiento de MDM2 diferentes (M376 o M380) o un vector no específico reordenado (scr) y se seleccionaron en puromicina durante 10 días antes de la extracción de proteínas para inmunotransferencia (A), o análisis de tinción con beta-galactosidasa asociada a senescencia. (B) o tinción con HP1 β (C). (D y E) Se transdujeron células LS8817 con un lentivirus que expresa un alelo de titubeo de MDM2 y se seleccionaron antes de la transducción secundaria con el lentivirus que expresa M380 y la selección en puromicina durante diez días antes de la inmunotransferencia (D) y la tinción con beta-galactosidasa asociada a senescencia (*p<0,05) (E). Estos experimentos se realizaron al menos tres veces con diferentes grupos de transductores con resultados similares cada vez.
- 25
- 30 FIGURAS 5A-D. La expresión forzada de MDM2 puede anular la actividad promotora de senescencia de PD0332991 pero no su capacidad para inducir la detención del crecimiento. (A) Inmunotransferencia. Se midió la cantidad de MDM2 en extractos preparados a partir de células tratadas con PD0332991 durante dos días o seleccionados para la expresión de shCDK4 tal como se muestra en la figura 3A. La tubulina era un control de carga. (B) Inmunotransferencia. Se transdujeron células con vectores lentivirales que expresaban RFP o MDM2 y se determinó la cantidad de proteínas 48 horas después del tratamiento con la dosis indicada de PD0332991. (C) Se midió la incorporación de BrdU en las células que expresaban RFP y MDM2 cuarenta y ocho horas después del tratamiento con la dosis indicada de PD0332991. (D) Se llevó a cabo la tinción con beta-galactosidasa asociada a senescencia en las células que expresaban RFP o MDM2 tratadas con diferentes dosis de PD0332991 durante siete días. Este experimento se llevó a cabo con tres grupos diferentes de transductores varias veces (*p<0,05, **p<0,01). r^2 se calcula como la correlación de ajuste óptimo.
- 35
- 40 FIGURAS 6A-B. PSM-Rb puede inducir senescencia. Se transdujeron las células que respondieron, LS8817 y LS0082, y las células que no respondieron, LS7785-1, con un lentivirus que expresaba el bolsillo grande de RB (LP) o un bolsillo grande no fosforilable de RB (PSM) y se seleccionaron durante 10 días en puromicina. Se evaluaron el efecto de estos productos génicos sobre la incorporación de BrdU y la expresión de proteínas (A) y la tinción con beta-galactosidasa asociada a senescencia (B) tal como se describe en las leyendas de las otras figuras. (B) Se midió Rb fosforilado endógeno como marcador de la actividad cinasa CDK4/6 en células que expresan los dominios de bolsillo LP o PSM. PD0332991 y las células de control no tratadas se muestran para una comparación. Este experimento se realizó al menos tres veces con diferentes grupos de transductores con resultados similares cada vez.
- 45
- 50 FIGURA 7. Los cambios en MDM2 se correlacionan con la respuesta de pacientes con WD/DDLS al tratamiento con PD0332991. Se inscribieron nueve pacientes acumulados entre enero de 2012 y agosto de 2012 en un ensayo clínico continuo de fase II de PD0332991. Se recogieron biopsias previas al tratamiento y biopsias posteriores al tratamiento de estos pacientes y se midió la expresión de MDM2 y RB mediante inmunotransferencia. GAPDH sirve como control de carga. Los pacientes, indicados por los números 1 a 9, se clasificaron en tres clases (PR, respuesta parcial; SD, enfermedad estable; POD, progresión de la enfermedad) basándose en su mejor respuesta al fármaco, tal como se mide por el crecimiento de la lesión objetivo mediante tomografía computarizada según criterios RECIST. Se midió el cambio en la expresión de MDM2 y se normalizó con respecto al cambio en GAPDH en cada par de muestras. Para el paciente 5, el cambio en MDM2 se resalta con un asterisco porque el valor se obtuvo normalizando MDM2 con respecto a actina (no mostrado). El signo del número en superíndice indica que el paciente se retiró del ensayo, y los triángulos indican que el paciente ha fallecido. Se indica el número de días que el paciente ha estado en el ensayo.
- 55
- 60

FIGURA 8. Alteraciones del número de copias en líneas celulares de WD/DDLS tal como se determina mediante hibridación genómica comparativa. Se identificaron amplificación (rojo) y deleciones (azul) usando el algoritmo RAE y se visualizan usando Integrated Genomic Viewer (<http://broadinstitute.org/igv>).

5 FIGURAS 9A-B. PD0332991 induce la detención de G1 en líneas celulares de liposarcoma. (A) Número de células aisladas de cultivos hechos crecer en presencia (líneas discontinuas) o ausencia (líneas continuas) de PD0332991 durante 4 días cuantificado diariamente mediante un contador Coulter y representado gráficamente en función del tiempo. (B) Se tiñeron células hechas crecer en presencia de PD0332991 durante dos días o que crecían de manera asincrónica en ausencia del fármaco (control) con yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la distribución del ciclo celular dentro del cultivo. Los porcentajes anotados en los gráficos representan la media de tres o más experimentos independientes.

10 FIGURAS 10A-C. PD0332991 induce un cambio en el volumen celular. Se tiñeron células hechas crecer en presencia o ausencia de PD0332991 durante 48 horas con faloidina o se analizaron mediante citometría de flujo. (A) Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de dos de las líneas celulares teñidas con faloidina (rojo) y DAPI (azul). (B) Se promediaron el tamaño celular medio en células de control no tratadas (negro) y células tratadas con PD0332991 (blanco) en tres ensayos independientes (\pm desviación estándar). (* $p < 0,05$) (C) Gráficos de dispersión directa obtenidos mediante citometría de flujo. Se indica la distribución de células de control no tratadas (rojo) y células tratadas con PD0332991 (azul). El valor medio máximo de tres experimentos independientes se cuantifica a continuación (tamaño celular medio + desviación estándar).

15 FIGURA 11. PD0332991 no induce diferenciación. Se trataron las líneas celulares o bien con PD0332991 (gris) o bien con un medio de diferenciación (Gimble, blanco) durante siete días y se compara la cantidad de ARN para cada producto génico indicado con la observada en células con buen crecimiento tratadas (ctrl, negro).

20 FIGURAS 12A-D. Se inhibió la expresión de CDK4 o CDK6 con ARNhp en comparación con controles reordenados (scr). Se seleccionaron todas las células infectadas durante diez días en puromicina. (A) Inmunotransferencia. Se prepararon extractos a partir de las células infectadas resistentes al tratamiento con puromicina y se midió la expresión de CDK4 y CDK6 mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. (B) Se marcaron las células infectadas con vectores que expresan ARNhp reordenado (negro), de CDK4 (gris) o ARNhp de CDK6 (blanco) con BrdU durante 2 horas. Se calculó el porcentaje medio de incorporación de BrdU a partir de tres o más ensayos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. (* $p < 0,05$). (C) Se calculó la tinción con β -galactosidasa asociada a senescencia y (D) con HP1 β para la formación de focos heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF) para células infectadas con ARNhp reordenado (negro), de CDK4 (gris) o ARNhp de CDK6 (blanco). (* $p < 0,05$). Estos experimentos se realizaron al menos tres veces con diferentes grupos de transductores con resultados similares cada vez.

25 FIGURAS 13A-B. La nutlina-3a induce apoptosis en todas las líneas celulares de liposarcoma. Se trataron las líneas celulares indicadas con nutlina-3a o control de vehículo y se prepararon extractos para inmunotransferencia (A) o tinción con anexina V (B) cuarenta y ocho horas después del tratamiento. Se calculó el porcentaje medio de células anexina V+/7-AAD- a partir de tres o más experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar (* $p < 0,05$).

30 FIGURAS 14A-B. La expresión y la senescencia de MDM2 se correlacionan con la amplificación de CDK4. (A) Se examinaron la tinción con β -galactosidasa asociada a senescencia y (B) con HP1 β en células LS6736 caracterizadas por amplificación de MDM2 pero no coamplificación de CDK4 después del tratamiento con PD0332991 (blanco) o medio de control (negro) durante siete días.

35 FIGURAS 15A-D. La senescencia inducida por PD0332991 se correlaciona con cambios en la expresión de MDM2. Se hicieron crecer células en presencia (blanco) o ausencia (negro) de PD0332991 durante 7 días. Porcentaje medio (\pm desviación estándar). (* $p < 0,05$). (A) Se detectó la cantidad de MDM2, p53, ciclina A, p16, p21 y tubulina mediante inmunotransferencia de extractos preparados a partir de células tratadas con PD0332991 (7D PD) o no tratadas en crecimiento asincrónico (ctrl) durante 7 días. (B) Micrografías de contraste de fase representativas de células teñidas para SA- β -gal en líneas celulares tratadas con medio de control (ctrl) o tratamiento farmacológico con PD0332991 (7D PD). (C) Se calculó la incorporación de BrdU y (D) β -galactosidasa asociada a senescencia para las células después del tratamiento con PD0332991 (7D PD) o medio de control (ctrl).

40 FIGURA 16. Se cultivaron células que respondieron LS8817 (negro) y que no respondieron LS8313 (gris claro) en presencia o ausencia de PD0332991 durante siete días y se representa gráficamente el efecto del fármaco sobre la expresión de citocinas a la izquierda. Se muestran autorradiografías representativas a la derecha.

45 FIGURA 17. La expresión forzada de MDM2 en LS8817 puede prevenir la pérdida inducida por PD0332991 de la proteína (izquierda) y la acumulación de células positivas para β -galactosidasa asociada a senescencia (derecha) pero no la reducción inducida por el fármaco de la incorporación de BrdU (centro). Se usaron como control células transducidas con un virus que expresa RFP.

50 FIGURAS 18A-E. El recambio de MDM2 está regulado de manera postraduccional y se asocia con una señalización desequilibrada. (A) Se transdujeron las células que respondieron, LS8817 y LS0082, y que no respondieron,

LS7785-1, con un lentivirus que expresa o bien el bolsillo grande de RB (LP) o bien un bolsillo grande no fosforilable de RB (PSM) y se seleccionaron durante cinco días en blasticidina. El efecto de estos productos génicos sobre la incorporación de BrdU se muestra a la izquierda, la tinción con beta-galactosidasa asociada a senescencia a la derecha y la expresión de MDM2, RB fosforilado, p53, p16, Arf y ciclina A en el centro. Este experimento se realizó al menos tres veces con diferentes grupos de transductores con resultados similares cada vez. (B) La privación de suero induce la detención del crecimiento pero no el cambio en MDM2 o la senescencia. Se hicieron crecer las células indicadas en suero al 0,5% (blanco) o se trataron con PD0332991 (gris) y se midió la proliferación mediante la incorporación de BrdU (izquierda) y el número de células que experimentan senescencia mediante tinción para β -galactosidasa asociada a senescencia (derecha). Se midió el nivel de MDM2 mediante inmunotransferencia (centro). La tubulina era un control de carga. (C) Se trataron las células con PD0332991 durante dos días y se determinó el efecto sobre los niveles de transcrito de MDM2 mediante qPCR. Este experimento se repitió al menos tres veces con diferentes réplicas biológicas. (D) Se trataron las líneas celulares indicadas con PD0332991 durante dos días y se añadió cicloheximida, y se recogieron muestras cada 15 minutos a partir de los 30-60 minutos para medir la cantidad de MDM2 mediante inmunotransferencia. La tubulina es un control de carga. Se representan gráficamente los datos compilados de al menos tres experimentos independientes (media y desviación estándar) y se muestra una inmunotransferencia representativa. (E) La privación de suero tiene un efecto más moderado sobre la semivida de MDM2 que la inhibición de CDK4. Se trataron las células con PD0332991 o suero al 0,5% y se determinó el efecto sobre los niveles de MDM2 mediante inmunotransferencia. Los gráficos se compilan a partir de los datos obtenidos con tres réplicas biológicas independientes y se muestran autorradiografías representativas.

FIGURAS 19A-C. La senescencia asociada con la regulación por disminución de MDM2 es independiente de p53 e INK4. (A) La capacidad de MDM2 para bloquear la senescencia inducida por PD0332991 depende de un dominio RING intacto, pero no de la capacidad de unirse a p53. Se transdujeron células con vectores lentivirales que codifican para los mutantes indicados de MDM2 y después de la selección se trataron con PD0332991 y se determinó la expresión de MDM2 mediante inmunotransferencia y el porcentaje de células que experimentan senescencia midiendo la β -galactosidasa asociada a senescencia. Este experimento se repitió tres veces con resultados similares tanto en LS8817 como en LS141. (B) Se trataron células de glioma (U87MG, U251, SNB19, DBTRG-05MG) y cáncer de mama (MDA453, T47D, ZR-75-1 y MCF7) con PD0332991 y se examinaron sus efectos sobre la senescencia y la expresión de proteínas tal como se describe. Se obtuvieron el estado mutacional de p53 de estas líneas celulares (WT, *wild type*, silvestre; R273H y L194F, mutaciones de cambio de sentido; if-DEL, delección en marco de 30 nucleótidos en el aminoácido 368) de la base de datos de mutaciones de p53 y el banco de datos de recursos biológicos RIKEN y concuerda con la detección de p21 mediante inmunotransferencia. (C) Se transdujeron células SNB19, un mutante de *p53* y célula deficiente en *INK4A*, con los mutantes descritos en el panel A y se determinó su efecto sobre la senescencia.

FIGURA 20. Modelo resumen. Este modelo resume los puntos clave que sugieren que es la señalización desequilibrada asociada con la detención del crecimiento inducida por la acumulación de RB no fosforilado lo que desencadena el cambio postraduccional en MDM2 que activa un programa de senescencia independiente de *p53* e *INK4A*. En células que no responden, la célula ni experimenta una detención desequilibrada ni puede activar la ruta de recambio de MDM2 que desencadena la ruta de senescencia independiente de *p53* e *INK4A*. La inhibición de CDK4 da como resultado adicionalmente la disociación del complejo de MDM2 y HAUSP en células que no responden y que responden.

FIGURAS 21A-B. El recambio de MDM2 está regulado de manera postraduccional. (A) Se trataron líneas celulares con PD0332991 durante dos días, después de lo cual se añadieron 10 μ M del inhibidor de proteasoma MG132 durante los tiempos indicados (horas). Se usó tubulina como control de carga. Este experimento se repitió dos veces con resultados similares. (B) Se seleccionaron células LS8817 transducidas o bien con un MDM2 marcado con etiqueta FLAG o bien un mutante C464A marcado con etiqueta FLAG de MDM2 y se midió el recambio de la proteína marcada con etiqueta FLAG mediante inmunotransferencia después de que se bloquease la síntesis de proteína con cicloheximida durante el tiempo indicado. Se muestra una inmunotransferencia representativa y la media y la desviación estándar se compilaron de dos experimentos independientes.

FIGURA 22. Análisis de inmunotransferencia adicional en células que responden y que no responden. Tal como se describe en la leyenda de la figura 5A, se usaron inmunotransferencias para medir la acumulación de p27, catalasa y p53 en células tratadas con PD0332991 y se extrajeron las proteínas en SDS-RIPA. La actina es un control de carga. Este experimento se repitió al menos tres veces para cada línea celular.

FIGURAS 23A-B. PD0332991 tiene poco efecto sobre los índices de activación de ATM, pero sí que resuelve los focos de daño del ADN en células que responden. (A) Se midieron CHK2, fosfoKAP1 y KAP1 total como marcadores de actividad de ATM en células tratadas con PD0332991. Se incluyeron como control extractos de fibroblastos de embrión de ratón irradiados y de control. La tubulina es un control. (B) Se puntuaron los focos de γ H2AX y 53BP1 en las líneas celulares indicadas. Según (Doil *et al.*, 2009; Panier *et al.*, 2012), tener una célula con más de 10 focos (blanco) se considera positivo para el daño del ADN. Tal como se esperaba para las líneas celulares de WD/DDLS, el nivel basal de daño en el ADN fue bastante alto. Aunque todas las líneas celulares salen del ciclo celular, PD0332991 conduce a la resolución de los focos de daño en las células que responden LS8817, pero no en las que no responden LS8107 y LS7785-10.

FIGURA 24. La senescencia inducida por PD0332991 no se correlacionó con la inducción o bien de E2F7 o bien de catalasa, un marcador de especies reactivas de oxígeno. Se midieron los niveles de E2F7 mediante inmunotransferencia 48 horas después del tratamiento con PD0332991 en las líneas celulares indicadas. La tubulina es un control de carga. Este experimento se repitió al menos dos veces para cada línea celular.

5 FIGURAS 25A-D. El recambio de MDM2 está regulado de manera postraduccional. (A) Se trataron las líneas celulares indicadas con PD0332991 durante dos días, después de lo cual se añadió MG132 5 μ M y continuó la incubación durante 2 horas adicionales. Se prepararon extractos y se inmunoprecipitó MDM2 y se determinó la presencia de HAUSP y MDM2 en los precipitados mediante inmunotransferencia. Se usó IgG como control de anticuerpo inespecífico para la inmunoprecipitación. (B) Las líneas celulares o bien se hicieron crecer de manera asincrónica o bien se trataron con PD0332991 durante 2 días y se midió la expresión de HAUSP y MDM2 mediante inmunotransferencia. La tubulina es un control de carga. Se redujeron los niveles de HAUSP con ARNhp en las líneas celulares indicadas y se midieron el efecto sobre la expresión de proteína (C) y la acumulación de células positivas para β -galactosidasa asociada a senescencia (D). Se compilaron la media y la desviación estándar de al menos dos experimentos independientes con cada línea celular y se muestra una inmunotransferencia representativa.

FIGURAS 26A-B. No se requiere p53 para la senescencia inducida por silenciamiento de MDM2 o PD0332991 en células LS8817. Se infectaron células LS8817 con lentivirus que expresan un ARNhp o bien reorganizado (shSCR) o bien que selecciona como diana dos p53 independientes (shp53a y shp53d2). Después de la selección, estas células o bien se trataron con PD0332991 (A) o bien se redujo MDM2 mediante superinfección con un lentivirus que expresa shM380 (B). Se determinaron la acumulación de β -galactosidasa asociada a senescencia (parte superior) y la expresión de MDM2 y p53 mediante inmunotransferencia (parte inferior). La tinción con Coomassie del gel indicó una carga equivalente.

FIGURA 27. Se silenció MDM2 en células SNB19 y MCF7 y se muestra el efecto sobre la acumulación de células positivas para β -galactosidasa asociada a senescencia (izquierda) y p53 y p21 (derecha). Este experimento se repitió dos veces.

5. Descripción detallada de la invención

Para mayor claridad y no a modo de limitación, la descripción detallada se divide en las siguientes subsecciones:

- (i) MDM2 como biomarcador;
- (ii) inhibidores de CDK4;
- (iii) dianas de cáncer;
- (iv) métodos de uso; y
- (v) kits.

5.1 MDM2 COMO BIOMARCADOR

Doble diminuto murino 2 se indica como MDM2 en el presente documento.

Un sujeto puede ser humano o no humano. Los ejemplos no limitativos de sujetos no humanos incluyen primates no humanos, perros, gatos, ratones, ratas, cobayas, conejos, cerdos, aves de corral, caballos, vacas, cabras, ovejas, cetáceos, etc.

En ciertos ejemplos no limitativos, un biomarcador de MDM2 puede ser una proteína.

En un ejemplo específico, no limitativo, una proteína MDM2 puede ser una proteína MDM2 humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en el n.º de registro de la base de datos de NCBI NP_002383 (SEQ ID NO: 1).

Las proteínas y los ácidos nucleicos de MDM2 para especies no humanas se conocen o pueden determinarse según métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, en los que la secuencia es el alelo representado en la mayoría de la población.

En un ejemplo específico, no limitativo, una proteína MDM2 puede ser una proteína MDM2 de ratón que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en el n.º de registro de la base de datos de NCBI NP_034916 (SEQ ID NO: 2).

En un ejemplo específico, no limitativo, una proteína MDM2 puede ser una proteína MDM2 de rata que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en el n.º de registro de la base de datos de NCBI NP_001101569 (SEQ ID NO: 3).

Un biomarcador de MDM2 es un biomarcador, que se manifiesta como niveles de expresión de MDM2 disminuidos tras el tratamiento con un inhibidor de CDK4, en relación con un nivel de criterio de referencia. Un nivel de criterio de

referencia de MDM2 puede establecerse, por ejemplo, usando un criterio de referencia tal como células cancerosas del sujeto antes del tratamiento con un inhibidor de CDK4 o en un cultivo paralelo de las células cancerosas del sujeto.

5 En ciertos ejemplos no limitativos de la divulgación, puede evaluarse un nivel de un biomarcador de MDM2 evaluando la función de MDM2, en el que el nivel de MDM2 es directamente proporcional al nivel de la función de MDM2.

10 En ejemplos no limitativos particulares, una reducción del nivel de biomarcador de MDM2 significa una reducción de al menos una cantidad estadísticamente significativa, o al menos aproximadamente el diez por ciento, o al menos aproximadamente el veinte por ciento, o al menos aproximadamente el treinta por ciento, o al menos aproximadamente el cuarenta por ciento, o al menos aproximadamente el cincuenta por ciento, en relación con el nivel de criterio de referencia.

15 Los métodos para detectar y/o determinar el nivel de un biomarcador de proteína incluyen, pero no se limitan a, técnicas de espectrometría de masas, sistemas de análisis basados en gel 1D o 2D, cromatografía, microalineamiento de proteínas, inmunofluorescencia, ensayos de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA), inmunotransferencia de tipo Western y otros ensayos mediados por inmunoglobulina, y otras técnicas conocidas en la técnica.

20 En ciertas realizaciones no limitativas, un método que puede usarse para detectar un biomarcador de MDM2 es la inmunotransferencia de tipo Western. Pueden recogerse células mediante tripsinización y homogeneizarse y/o sonicarse en tampón de lisis. Los lisados pueden clarificarse mediante centrifugación y someterse a SDS-PAGE seguido de transferencia a una membrana, tal como una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF). Pueden ponerse en contacto entonces anticuerpos (sin marcar), específicos de un biomarcador, por ejemplo, de MDM2 con la membrana y someterse a ensayo mediante un reactivo inmunológico secundario, tal como anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado. Los ejemplos no limitativos de marcadores incluyen, entre otros, ¹²⁵I, peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. En ciertos ejemplos, puede realizarse inmunodetección con anticuerpos contra un biomarcador usando el sistema de quimioluminiscencia mejorado (por ejemplo, de PerkinElmer Life Sciences, Boston, Mass.). La membrana puede separarse entonces y volver a someterse a transferencia con un anticuerpo de control, por ejemplo, anti-tubulina. En ciertas realizaciones, el nivel de un biomarcador puede normalizarse frente al nivel de una proteína de control, por ejemplo, tubulina o actina, detectada en la misma muestra.

30 En ciertos ejemplos no limitativos, puede usarse inmunohistoquímica para detectar un biomarcador de MDM2. Por ejemplo, un primer anticuerpo puede ponerse en contacto con una muestra, por ejemplo, una capa delgada de células, seguido de lavado para retirar el anticuerpo no unido, y luego ponerse en contacto con un segundo anticuerpo marcado. El marcaje puede ser mediante marcadores fluorescentes, enzimas, tales como peroxidasa, avidina o radiomarcaje. En ciertos ejemplos, el primer anticuerpo puede conjugarse con un fluoróforo para la detección directa. El marcaje puede puntuarse visualmente mediante microscopía y los resultados pueden cuantificarse.

5.2 INHIBIDORES DE CDK4

40 Los ejemplos no limitativos de inhibidores de CDK4 incluyen compuestos que inhiben la actividad cinasa de CDK4. Los ejemplos adicionales no limitativos de inhibidores de CDK4 incluyen inhibidores de CDK4 competitivos con ATP. En realizaciones no limitativas particulares, el inhibidor de CDK4 se deriva de compuestos de piridopirimidina, pirrolopirimidina o indolocarbazol. Otros ejemplos no limitativos de inhibidores de CDK4 incluyen isetionato de palbociclib, LEE011 (número CAS 1211441-98-3), LY2835219 (número CAS 1231930-82-7), PD0332991 y clorhidrato de flavopiridol. Se describen inhibidores de CDK4 adicionales en las patentes estadounidenses n.ºs 6.630.464 y 6.818.663 y las solicitudes de patente estadounidense n.ºs U.S. 2012/0244110, 2012/0207763 y 2011/0152244.

45 Otros ejemplos no limitativos de inhibidores de CDK4 incluyen oligonucleótidos antisentido, moléculas de ARNhp y moléculas de ARNip que inhiben específicamente la expresión o actividad de CDK4. Un ejemplo no limitativo de un inhibidor de CDK4 comprende una secuencia de ácido nucleico antisentido, ARNhp o ARNip homóloga a al menos una parte de una secuencia de ácido nucleico de CDK4, en el que la homología de la parte con relación a la secuencia de CDK4 es de al menos aproximadamente el 75 o al menos aproximadamente el 80 o al menos aproximadamente el 85 o al menos aproximadamente el 90 o al menos aproximadamente el 95 o al menos aproximadamente el 98 por ciento, en el que el porcentaje de homología puede determinarse, por ejemplo, mediante el software BLAST o FASTA. En ciertas realizaciones no limitativas, la parte complementaria puede constituir al menos 10 nucleótidos o al menos 15 nucleótidos o al menos 20 nucleótidos o al menos 25 nucleótidos o al menos 30 nucleótidos y las moléculas de ácido nucleico antisentido, ARNhp o ARNip pueden tener hasta 15 o hasta 20 o hasta 25 o hasta 30 o hasta 35 o hasta 40 o hasta 45 o hasta 50 o hasta 75 o hasta 100 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, el inhibidor de CDK4 es un ARNhp que comprende la secuencia de ácido nucleico GAGATTACTTTGCTGCCTTAA (SEQ ID NO: 4). Las moléculas antisentido de ARNhp, ARNhp o ARNip pueden comprender ADN o residuos atípicos o que no se producen de manera natural, por ejemplo, pero sin limitarse a, residuos de fosforioato.

5.3 DIANAS DE CÁNCER

Los ejemplos no limitativos de cánceres que pueden ser objeto de la presente invención incluyen liposarcoma, glioma (o glioblastoma), osteosarcomas, melanoma, oligodendroglioma, astrocitoma, neuroblastoma, tumores neuroendocrinos de páncreas y cáncer de mama.

5 5.4 MÉTODOS DE USO

En ciertas realizaciones no limitativas, la presente invención proporciona un método *in vitro* para determinar si es probable que un inhibidor de CDK4 produzca un efecto anticancerígeno en un cáncer, que comprende determinar si las células del cáncer tienen una expresión reducida de MDM2 tras el tratamiento con el inhibidor de CDK4, en el que si la expresión de MDM2 está reducida, es más probable que el inhibidor de CDK4 tenga un efecto anticancerígeno sobre el cáncer, en el que el cáncer se elige del grupo que consiste en liposarcoma, glioma y cáncer de mama, y

el inhibidor de CDK4 seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de CDK4 competitivo con ATP, un inhibidor de CDK4 derivado de compuestos de piridopirimidina, pirrolopirimidina o indolocarbazol, isetionato de palbociclib, LEE011, LY2835219, PD0332991, clorhidrato de flavopiridol, un oligonucleótido antisentido una molécula de ARNhp o molécula de ARNip que inhibe la expresión o actividad de CDK4.

Por ejemplo, la reducción puede apreciarse comparando el nivel de biomarcador de MDM2 en el cáncer como consecuencia del tratamiento con inhibidor de CDK4 con un criterio de referencia tal como se describió anteriormente.

Los biomarcadores de MDM2 se describen en las secciones anteriores. Los inhibidores de CDK4 se describieron anteriormente. Los cánceres adecuados para el tratamiento se describieron anteriormente.

En ciertos ejemplos no limitativos, la presente divulgación proporciona un método para determinar si es probable que un inhibidor de CDK4 produzca un efecto anticancerígeno en un cáncer, que comprende obtener una muestra del cáncer antes y tras el tratamiento con un inhibidor de CDK4 y determinar, en las muestras, el nivel de expresión de un biomarcador de MDM2, en el que si el nivel de expresión del biomarcador de MDM2 está disminuido tras el tratamiento con un inhibidor de CDK4, es más probable que un inhibidor de CDK4 tenga un efecto anticancerígeno en el cáncer. Se exponen métodos para determinar los niveles de expresión de un biomarcador de MDM2 en la sección 5.1 anterior. Tal como se indicó anteriormente, la reducción puede apreciarse comparando el nivel de biomarcador de MDM2 en el cáncer como consecuencia del tratamiento con inhibidor de CDK4 con un nivel de criterio de referencia. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el nivel de criterio de referencia puede establecerse usando células cancerosas del sujeto antes del tratamiento con un inhibidor de CDK4.

Un efecto anticancerígeno significa una o más de una reducción de la masa de células cancerosas total, una reducción de la velocidad de crecimiento de células cancerosas, una reducción de la proliferación de células cancerosas, una reducción de la masa tumoral, una reducción del volumen tumoral, una reducción de la proliferación de células tumorales, una reducción de la velocidad de crecimiento tumoral, una reducción de la metástasis tumoral y/o un aumento de la proporción de células cancerosas senescentes.

En ciertos ejemplos no limitativos, la presente divulgación proporciona un método para producir un efecto anticancerígeno por un inhibidor de CDK4 en un sujeto, que comprende obtener una muestra del cáncer antes del tratamiento del sujeto con un inhibidor de CDK4 y determinar, en una o más células cancerosas de la muestra, el efecto del tratamiento con el inhibidor de CDK4 sobre el nivel de biomarcador de MDM2, en el que si el nivel de expresión del biomarcador de MDM2 está disminuido tras el tratamiento con el inhibidor de CDK4, entonces se inicia el tratamiento del sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de CDK4.

En ciertos ejemplos no limitativos, la presente divulgación proporciona un método para producir un efecto anticancerígeno por un inhibidor de CDK4, que comprende obtener una muestra del cáncer tras el tratamiento con un inhibidor de CDK4 y determinar, en una o más células cancerosas de la muestra, el nivel de expresión de un biomarcador de MDM2, en el que si el nivel de expresión del biomarcador de MDM2 está disminuido tras el tratamiento con un inhibidor de CDK4, entonces se continúa o reanuda el tratamiento del sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK4. Opcionalmente, puede recogerse una muestra antes y después del tratamiento y comparar los niveles de MDM2.

En ciertos ejemplos no limitativos, la presente divulgación proporciona un método para producir un efecto anticancerígeno por un inhibidor de CDK4, en el que el inhibidor de CDK4 usado para tratar a un sujeto después de la detección de una disminución de los niveles de expresión de MDM2 puede ser el mismo o diferente del inhibidor de CDK4 administrado durante la determinación del cambio en el nivel de expresión de MDM2 en el sujeto. En ciertos ejemplos no limitativos, el inhibidor de CDK4 usado para tratar al sujeto después de la detección de una disminución de los niveles de expresión de MDM2 puede ser de la misma clase química o diferente que el inhibidor de CDK4 administrado durante la determinación del cambio en el nivel de expresión de MDM2 en el sujeto. En ciertos ejemplos no limitativos, el inhibidor de CDK4 usado para tratar al sujeto después de la detección de una disminución de los niveles de expresión de MDM2 puede funcionar mediante un mecanismo similar o diferente que

el inhibidor de CDK4 administrado durante la determinación del cambio en el nivel de expresión de MDM2 en el sujeto.

5 En ciertos ejemplos no limitativos, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene un cáncer, que comprende, obtener una muestra del cáncer antes del tratamiento del sujeto con un inhibidor de CDK4, y determinar, en una o más células cancerosas de la muestra, el efecto del tratamiento con el inhibidor de CDK4 sobre el nivel del biomarcador de MDM2, en el que si el nivel de expresión del biomarcador de MDM2 está disminuido tras el tratamiento con el inhibidor de CDK4, entonces se inicia el tratamiento del sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de CDK4.

10 En ciertos ejemplos no limitativos, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene un cáncer, que comprende, obtener una muestra del cáncer tras el tratamiento con un inhibidor de CDK4 y determinar, en la muestra, el nivel de expresión de un biomarcador de MDM2, en el que si el nivel de expresión del biomarcador de MDM2 está disminuido tras el tratamiento con un inhibidor de CDK4 en comparación con un nivel de criterio de referencia, entonces se continúa o reanuda el tratamiento del sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK4. Opcionalmente, puede recogerse una muestra antes y después del tratamiento y
15 comparar los niveles de MDM2.

Cualquiera de los métodos anteriores puede comprender una etapa de recogida de una o más muestras de células cancerosas del sujeto, en la que una célula o células del sujeto pueden usarse para determinar el efecto del inhibidor de CDK4 del nivel de biomarcador de MDM2.

20 Cualquiera de los métodos anteriores puede comprender además una etapa de detectar uno o más marcadores de senescencia en una muestra tras el tratamiento con un inhibidor de CDK4.

Cualquiera de los métodos anteriores puede comprender además determinar el nivel de RB fosforilado en una muestra tras el tratamiento con un inhibidor de CDK4, en el que si el nivel de RB fosforilado está disminuido tras el tratamiento con un inhibidor de CDK4, es más probable que el inhibidor de CDK4 haya reducido la actividad cinasa de CDK4. En ciertos ejemplos, la reducción puede apreciarse comparando el nivel de RB fosforilado en el cáncer
25 y consecuencia del tratamiento con inhibidor de CDK4 con un nivel de referencia. Un nivel de referencia de RB fosforilado puede establecerse, por ejemplo, usando células cancerosas del sujeto antes del tratamiento con un inhibidor de CDK4 o en un cultivo paralelo de las células cancerosas del sujeto.

30 En ciertos ejemplos no limitativos, una muestra incluye, pero no se limita a, una muestra clínica, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma sanguíneo, líquido biológico (por ejemplo, líquido linfático) y muestras de tejido. La fuente de la muestra puede ser tejido sólido (por ejemplo, de un órgano fresco, congelado y/o conservado, muestra de tejido, biopsia o aspirado), sangre o cualquier componente sanguíneo, líquidos corporales (tales como, por ejemplo, orina, linfa, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial) o células del individuo, incluyendo células tumorales circulantes. En ciertos ejemplos no limitativos, la muestra se obtiene de un tumor.

35 En ciertos ejemplos no limitativos, cuando el nivel de expresión de un biomarcador de MDM2 no está disminuido en las células cancerosas tras el tratamiento con un inhibidor de CDK4, el sujeto del que derivan las células cancerosas se trata con otra modalidad, por ejemplo, se administra un agente quimioterápico, agente anticancerígeno biológico o radioterapia alternativos.

40 Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que puede lograr uno o más de un efecto anticancerígeno, prolongación de la supervivencia y/o prolongación del periodo hasta la recidiva. Se exponen métodos para determinar los niveles de biomarcadores de MDM2 en la sección 5.1 anterior.

5.5 KITS

45 En ejemplos no limitativos, la presente divulgación proporciona un kit para determinar si es probable que un inhibidor de CDK4 produzca un efecto anticancerígeno en un cáncer, que comprende un medio para detectar el nivel de expresión de un biomarcador. Los biomarcadores de MDM2 y el método para medir los niveles de biomarcadores de MDM2 se describen en las secciones anteriores.

Los tipos de kits incluyen, entre otros, alineamientos/microalineamientos, perlas y anticuerpos específicos de biomarcadores, que contienen además una o más sondas, anticuerpos u otros reactivos de detección para detectar uno o más biomarcadores de la presente divulgación.

50 En ejemplos no limitativos, la presente divulgación proporciona un kit para determinar si es probable que el inhibidor de CDK4 produzca el efecto anticancerígeno en un cáncer, que comprende un medio para detectar los niveles de proteína de un biomarcador.

55 En ejemplos no limitativos, un kit puede comprender al menos un anticuerpo para la inmunodetección del/de los biomarcador(es) que va(n) a identificarse. Los anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, incluyendo moléculas que comprenden una región variable de anticuerpo o una subregión de MDM2 del mismo, específica para

- 5 un biomarcador de MDM2, pueden prepararse usando técnicas de inmunización convencionales, como conocerán generalmente los expertos en la técnica. Los reactivos de inmunodetección del kit pueden incluir marcadores detectables que están asociados o vinculados con el anticuerpo o antígeno dado. Tales marcadores detectables incluyen, por ejemplo, moléculas quimioluminiscentes o fluorescentes (rodamina, fluoresceína, proteína fluorescente verde, luciferasa, Cy3, Cy5 o ROX), radiomarcadores (^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{14}C y ^{131}I) o enzimas (fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante). Alternativamente, un resto detectable puede estar comprendido en un anticuerpo secundario o fragmento de anticuerpo que se une selectivamente al primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo (en el que dicho primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo reconoce específicamente MDM2).
- 10 En otro ejemplo no limitativo, el anticuerpo específico de biomarcador de MDM2 puede proporcionarse unido a un soporte sólido, tal como una matriz de columna, un alineamiento o pocillo de una placa de microtitulación. Alternativamente, el soporte puede proporcionarse como un elemento independiente del kit.
- En un ejemplo específico no limitativo, un kit puede comprender una sonda, un microalineamiento o anticuerpo adecuado para detectar un biomarcador de MDM2.
- 15 En un ejemplo no limitativo específico, un kit puede comprender además una sonda, un microalineamiento o anticuerpo adecuado para detectar RB fosforilado.
- En ciertos ejemplos no limitativos, cuando el medio de medición en el kit emplea un alineamiento, el conjunto de biomarcadores establecidos anteriormente puede constituir al menos el 10 por ciento o al menos el 20 por ciento o al menos el 30 por ciento o al menos el 40 por ciento o al menos el 50 por ciento o al menos el 60 por ciento o al menos el 70 por ciento o al menos el 80 por ciento de las especies de marcador representadas en el microalineamiento.
- 20 En ciertos ejemplos no limitativos, un kit puede contener además medios para detectar un marcador de senescencia. Por ejemplo, en ciertos ejemplos no limitativos, el kit puede comprender además un anticuerpo adecuado para detectar focos heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF, por sus siglas en inglés), por ejemplo, un anticuerpo específico para HP1 α . En ciertos ejemplos no limitativos, el kit puede comprender un anticuerpo adecuado para detectar la α -galactosidasa asociada a senescencia.
- 25 En ciertos ejemplos no limitativos, un kit puede comprender además una sonda, un microalineamiento o anticuerpo adecuado para detectar niveles de proteína de retinoblastoma (RB). Por ejemplo, el kit puede comprender una sonda, un microalineamiento o anticuerpo adecuado para detectar la forma fosforilada de RB (por ejemplo, p-RB Ser780).
- 30 En ciertos ejemplos no limitativos, un kit de detección de biomarcadores puede comprender uno o más reactivos de detección y otros componentes (por ejemplo, un tampón, enzimas tales como fosfatasa alcalina, anticuerpos y similares) necesarios para llevar a cabo un ensayo o una reacción para determinar los niveles de expresión de un biomarcador.
- 35 En ciertos ejemplos no limitativos, un kit puede contener además medios para comparar el biomarcador con un criterio de referencia. Por ejemplo, en ciertas realizaciones no limitativas, el kit puede comprender además una sonda, un microalineamiento o anticuerpo adecuado para detectar proteínas que puede usarse como control para normalizar los niveles de expresión de proteínas. Ejemplos no limitativos de tales proteínas incluyen tubulina y actina.
- 40 Un kit puede incluir además instrucciones para usar el kit para determinar el nivel de expresión del biomarcador de MDM2. Específicamente, las instrucciones describen que la disminución de los niveles de expresión de un biomarcador de MDM2 tras el tratamiento con un inhibidor de CDK4, expuesta en el presente documento, es indicativa de una mayor posibilidad de un efecto anticancerígeno en un cáncer por un inhibidor de CDK4.
- 45 Se ha descubierto que la amplificación o actividad de CDK4 se correlacionaba con la acumulación de la proteína MDM2 del locus amplificado en algunas células, y la expresión sostenida de la proteína MDM2 en células quiescentes desempeñaba un papel crítico en la supresión de una ruta de senescencia asociada a RB. Además, observando la respuesta de los pacientes al tratamiento con PD0332991 y midiendo la cantidad de MDM2 en biopsias previas y posteriores al tratamiento, se halló que las reducciones de MDM2 se correlacionaban con un desenlace favorable.

6.1 MATERIALES Y MÉTODOS

- 50 Cultivo de líneas celulares, diferenciación y validación. Se desarrollaron líneas celulares a partir de tumores de WD/DDLS resecados de pacientes quirúrgicos después de obtener el consentimiento informado. Se han descrito previamente LS8817 y LS0082 usando la nomenclatura DDLS8817 y WD0082. Se extrajo ADN de las líneas celulares usando protocolos habituales (QIAGEN DNEasy) y se confirmó el linaje mediante un alineamiento de número de copias para confirmar la amplificación del segmento 12q13-15 (Agilent 244K según las especificaciones del fabricante). Se realizó el análisis de los datos comparativos de hibridación genómica usando una cartera personalizada, que realiza la segmentación binaria circular habitual de la biblioteca de copias de ADN
- 55

R/bioconductor y procesa todas las muestras con el algoritmo RAE (47).

Se mantuvieron las líneas celulares en DMEM con alto contenido de glucosa (HG, *high glucose*) complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10%. Se mantuvieron líneas celulares de glioma, DKMG, SNB19, DBTRG-05MG y T89G, en DMEM HG complementado con suero bovino fetal al 10% y glutamina 2 mM. Se mantuvo la línea celular de cáncer de mama MCF7 en medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10% y glutamina 2 mM. Se extrajo ARN de las células (RNEasy, QIAGEN) y se realizó transcripción inversa (22) después del tratamiento durante 7 días con PD0332991 (Selleckchem) o medios de diferenciación tal como se describió previamente (21).

Selección como diana de genes por ARNhp. Se suministraron ARNhp en el vector pLKO.1 (Sigma) y se seleccionaron células infectadas usando puromicina (1 μ g/ml); se usó como control la infección con un virus que porta un control de reordenamiento (CAACAAGATGAAGAGCACCAA) en todos los experimentos que utilizan ARNhp. Se trataron líneas celulares con PD0339221 o ARNhp dirigido contra CDK4 (GAGATTACTTTGCTGCCTTAA (SEQ ID NO: 4)), MDM2 (M376, TTCACTATTCCACTACCAAAG (SEQ ID NO: 5); M380, TACTAGAAGTTGATGGCTGAG (SEQ ID NO: 6)), CCAGCTAAGTATCAAAGGAAA (SEQ ID NO: 7); 845, CGTGGTGTCAAGGTGACTAA (SEQ ID NO: 8)) o CDK6 (GACCTGGAAAGGTGCAAAGAA (SEQ ID NO: 9)) durante de 48 horas a 7 días y se tiñeron con BrdU (20 μ M durante dos horas) o anexina V tal como se describió previamente (22, 48). Se determinó el contenido de G0 mediante tinción con yoduro de propidio y análisis mediante FACS (49).

Ensayos de proliferación y apoptosis. Se tiñeron células con BrdU (20 μ M durante dos horas) o anexina V tal como se describió previamente (22, 48). Se determinó el contenido de G0 mediante tinción con yoduro de propidio y análisis mediante FACS (49).

Análisis de senescencia. Se sembraron células en placa a una concentración de 25.000 por pocillo en portaobjetos de cámara de 4 pocillos (Lab-Tek) y se trataron durante siete días con un fármaco o ARNhp tal como se describió anteriormente y se tiñeron para la β -galactosidasa asociada a senescencia (kit de señalización celular #9860). Se cuantificó el número de células mediante tinción con DAPI y se cuantificó la tinción con β -galactosidasa como una proporción de las células totales. Se cuantificaron los focos heterocromáticos asociados a senescencia después de que las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Tritón al 0,1%, se bloquearon con FBS al 2% y se tiñeron con anticuerpos contra HP1 α (dilución 1:5000, 2MOD-1G6 Millipore). Se identificaron células senescentes mediante inmunofluorescencia después del tratamiento de portaobjetos con anticuerpos secundarios anti-ratón y cuantificación de SAHF focal como porcentaje de las células totales (microscopio confocal Upright Confocal SP5 de Leica). Se marcó la actina usando tinción con faloidina (1:500, Invitrogen) y se contratiñeron las células con DAPI. Se midió el área celular con el software Metamorph para calcular el área relativa por célula.

Se adquirieron alineamientos de citocinas humanas de R&D Technologies (ARY006). Se trataron las células en platos de 10 cm con PD0332991 1 μ M o se dejaron sin tratar como control. Se cambió el medio 24 horas antes de la recogida. El día de la recogida, se recogió el medio, se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm y se filtró a través de una jeringa de 45 μ M para retirar los residuos. Se tripsinizaron las células y se contaron y se ajustó el volumen del medio para que se representara un número igual de células de cada muestra. Se realizaron alineamientos de citocinas según el protocolo del fabricante. Se midió la intensidad de señal usando ImageJ y se calculó un valor de \log_2 de la razón PD/CTRL.

Inmunotransferencia. Se obtuvieron anticuerpos contra CDK4 (3F121), MDM2 (N-20 y SMP14), RB total (IF8), ciclina A (H432), p16 (C20), p53 (DO-1 y Bp53-12), tubulina (C20) y FLAG (M2) de Santa Cruz Biotechnology, fosfo-Rb 780 (#9307) de Cell Signaling y ARF (3642) de Abcam, HAUSP (A300-033A) de Bethyl Laboratories. Las células tratadas se lisaron con tampón que se componía de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, NP40 al 0,5%, PMSF 2 mM, y complementado con inhibidores de la proteasa. Se resolvieron ochenta microgramos de proteína mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Se incubaron las membranas durante la noche con anticuerpos (1:1000). Se prepararon extractos a partir de biopsias previas y posteriores al tratamiento de pacientes tratados con 125 mg de PD0332991 diariamente durante 3 semanas seguido de una semana de descanso. Los ciclos se repitieron cada cuatro semanas y los pacientes todavía están en el ensayo. Se recogieron biopsias previas al tratamiento en el plazo de las dos semanas posteriores a la primera dosis y se recogieron biopsias posteriores al tratamiento después de las últimas tres semanas de tratamiento. Se prepararon extractos en Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,25% y complementado con cóctel de inhibidor de mini-proteasa (Roche). Se evaluó la respuesta tumoral por el radiólogo de referencia mediante TAC cada seis semanas durante 36 semanas, y cada 12 semanas después de eso. El ensayo clínico estuvo aprobado por la Junta de Revisión Institucional del Centro de Cáncer Memorial Sloan-Kettering y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito (NCT01209598).

Rescate de titubeo. En primer lugar, se infectaron células con un lentivirus (pLOC, Open Biosystems) que codifica para o bien un casete de expresión de MDM2 que contiene la secuencia con apareamiento erróneo (ACTATTCTCAACCCTCAACTTCTA (SEQ ID NO: 10)) o bien un casete RFP. 24 horas después, se seleccionaron las células transducidas en medios que contenían blasticidina 3 μ g/ml y se mantuvo la selección durante todo el experimento. Cinco días después de que comenzara la selección con blasticidina, se transdujeron las células con un

segundo vector lentiviral que codifica o bien para la secuencia shM380 que selecciona como diana MDM2 o bien para una secuencia reordenada (shSCR) tal como se describió anteriormente. 24 horas después, se seleccionaron estas células en medios que contenían tanto blasticidina como puromicina 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

5 Recambio de MDM2. Se sembraron 250.000 células en placas de 6 cm y se trataron con PD0332991 1 μM durante 48 h. Luego se retiró el medio y se reemplazó por medio que contenía cicloheximida 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (y PD0332991 según sea necesario). Se recogieron las placas en los puntos de tiempo indicados y se procesaron las células para inmunotransferencia tal como se describió anteriormente. Se midió la intensidad de señal usando ImageJ y se normalizó con respecto a la intensidad de tubulina correspondiente. Se representaron gráficamente los datos y se calculó el descenso monofásico de ajuste óptimo usando GraphPad Prism 6.

10 6.2 RESULTADOS

15 La inhibición farmacológica de CDK4 puede inducir senescencia en un subconjunto de líneas celulares de liposarcoma positivas para RB. Los inhibidores de molécula pequeña de CDK4 inhiben de manera potente la proliferación celular de una manera dependiente de RB. En algunas circunstancias, estas células quiescentes pueden experimentar senescencia, una forma especializada de detención del crecimiento, aunque el mecanismo que controla esta transición no se comprende completamente (17, 18). Para determinar cómo la inhibición de CDK4 afectaría a WD/DDLS, se trató una colección de siete líneas celulares derivadas de pacientes positivos para RB que tenían amplificaciones comunes de MDM2 y CDK4 pero también contenían una variedad heterogénea de mutaciones secundarias y posiblemente alteraciones adicionales en las mutaciones iniciadoras también (figura 8) con PD0332991. La adición de PD0332991 a las células en crecimiento asincrónico dio como resultado la detención del crecimiento en el plazo de un solo ciclo celular (figura 9A) acumulándose células en G0/G1 (figura 9B) y una reducción significativa de la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU; figura 1A). Tal como se esperaba, se acumuló RB no fosforilado en estas células (figura 1C) y en tratamientos más largos la cantidad de RB disminuyó (datos no mostrados), lo que indica que el fármaco alcanzó la diana. PD0332991 no indujo un cambio significativo en la tinción con anexina V, un marcador de apoptosis, en ninguna de las líneas celulares (figura 1B). Con el tratamiento continuado con PD0332991, las siete líneas celulares cultivadas comenzaron a tener un aspecto confluyente. Cuando se rastreó el perímetro celular después de teñir estos cultivos con faloidina, que resalta el citoesqueleto de actina, estuvo claro que las células estaban agrandadas. También se confirmó un aumento del volumen celular mediante citometría de flujo. Se muestran datos representativos en las figuras 10A-C.

30 En algunas circunstancias, las células quiescentes experimentan senescencia, una forma estable especializada de detención del crecimiento (17, 18). Las rutas moleculares que controlan esta transición no se entienden completamente. Las células senescentes se caracterizan a menudo por una morfología aplanada y agrandada (19). Para determinar si PD0332991 indujo senescencia en estas células, se midió la acumulación de β -galactosidasa asociada de manera perinuclear (SA- β -gal) (figura 2A) y la acumulación de focos heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF), según se marcó mediante HP1 β , una proteína se sabe que se acumula en estas estructuras (20) (figura 2B). En tres líneas celulares (LS8817, LS141 y LS0082), pero no en las otras cuatro (LS8107, LS7785-10, LS7785-1 y LS8313), se observó un aumento significativo del número de células positivas para SA- β -gal o SAHF siete días después de la exposición a PD0332991 a concentraciones de tan sólo 100 nM. No hubo aumento del número de células LS7785-1, LS7785-10, LS8107 y LS8313 positivas para SA- β -gal o SAHF ni siquiera cuando se aumentó la concentración de PD033299 diez veces.

40 De manera acorde con estas diferencias en la naturaleza de la detención del crecimiento entre las líneas celulares, las que no se tiñeron para SAHF o SA- β -gal (LS8107 y LS7785-1) después de siete días de tratamiento farmacológico volvieron al ciclo celular en el plazo de las 48 horas después de que se eliminó el fármaco (figura 2C). Las que expresaron marcadores de senescencia (LS8817 y LS0082) no lo hicieron (figura 2C). Incluso en momentos posteriores, solo se detectó una incorporación limitada de BrdU en los cultivos que contenían células que expresaban marcadores de senescencia, que se cree que son aquellas células que no experimentaron la transformación a senescencia.

La capacidad de PD0332991 para inducir senescencia no se asoció con el tiempo de duplicación de las células. LS8817, LS141 y LS0082 experimentaron senescencia cuando se trataron con el fármaco, pero LS8313 no aunque creció tan rápido como las demás (figura 9A).

50 Dada la evidencia celular de senescencia, se examinó la expresión de Arf, p53 y p16, tres proteínas que se acumulan normalmente en células senescentes (30, 28, 19) y varias citocinas asociadas con el programa secretor asociado a senescencia (SASP; 54, 55, 38, 40, 41). No se observó ninguna diferencia en la expresión de Arf, p53 o p16 en dos de las líneas celulares en las que se acumularon SA- β -gal y SAHF en comparación con dos de las que no lo hicieron (figura 2D); sorprendentemente, la cantidad de p53 incluso disminuyó en las líneas celulares tras el tratamiento farmacológico. Se observaron disminuciones similares de Arf y p53 en las otras líneas celulares también. Los niveles reducidos de ciclina A en las células tratadas con fármaco confirmaron que PD0332991 inhibió la proliferación celular y alcanzó su diana.

La senescencia puede asociarse con una mayor expresión de varias citocinas. Esto se define como el programa secretor asociado a la senescencia (SASP; 54, 55, 38, 40, 41). Por otro lado, se observaron diferencias en la

secreción de citocinas al comparar la línea celular LS8817, en la que se acumularon SA- β -gal y SAHF, con la línea celular LS8313 en la que no lo hicieron. De las 36 citocinas que se investigaron en este alineamiento de proteínas, 17 se han implicado como parte del SASP. De estas 17, siete eran detectables en los medios, un número que concuerda con estudios previos en otras líneas celulares no fibroblásticas (56, 57). En LS8817, la secreción de GM-CSF, GRO α /CXCL1, IL-6, IL-8 y MCP-1 estaba regulada por incremento tras el tratamiento con PD0332991. MIF-1 y PAI-1, otros dos factores de SASP detectables, esencialmente no cambiaron. En LS8313, solo aumentó la secreción de IL-6, y esto fue moderado en comparación con el cambio en los niveles observados en las células LS8817 (figura 16). Se observaron patrones similares de expresión de citocinas al comparar las células LS0082 y LS8107, un segundo par de células que experimentan senescencia o quiescencia, respectivamente.

La senescencia puede activarse por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o daños en el ADN. Por tanto, se examinó si PD0332991 inducía la expresión de catalasa en dos líneas celulares que experimentan senescencia inducida por PD0332991 y dos líneas celulares que no. La catalasa aumentó en las cuatro líneas celulares (figura 22), lo que indica que PD0332991 podría aumentar las ROS en ambos tipos de células que no ciclan, pero esto no fue un determinante clave de si las células experimentaban senescencia. Adicionalmente, PD0332991 no indujo cambios significativos en la movilidad de CHK2 o la fosforilación de KAP1, dos marcadores de actividad ATM, en las líneas celulares que experimentaron senescencia (LS8817 y LS141) o aquellas que experimentaron quiescencia (LS8107, LS8313 y LS7785-1). Por el contrario, estas proteínas aumentaron claramente después del daño del ADN inducido por radiación en fibroblastos de embriones de ratón (figura 23A). Sin embargo, en las células LS8817, el número de focos de γ H2Ax y 53BP1, marcadores de una respuesta frente a daño de ADN activada, se redujeron tras el tratamiento con PD0332991 (figura 23B). El número de focos no se vio afectado en gran medida en otras dos líneas celulares que experimentaron quiescencia inducida por PD0332991 (LS8107 y LS7785-10, figura 23B). Esto indica que la reparación del ADN en curso y el daño del ADN pueden desacoplarse de la senescencia inducida por PD0332991.

Recientemente también se ha informado de la acumulación de E2F7 en células senescentes (5). Aunque PD0332991 indujo la acumulación de E2F7 en LS8817, LS0082 y LS8313, la cantidad de proteína no cambió en LS8107. E2F7 era indetectable en LS7785-1 y LS141 (figura 24). Por tanto, no pudo correlacionarse la inducción de E2F7 con la acumulación de SA- β -gal y SAHF inducida por PD0332991.

Las rutas alternativas en las que se acumulan las células en G0/G1, tales como la diferenciación, es decir, la adopción de un destino celular alternativo, podrían impedir la inducción de un programa de senescencia. Se midieron tres marcadores de adipocitos diferenciados, CEBP α , FABP4 y ARNm de PPAR α en células LS8107 y LS7785-10, dos de las líneas celulares que experimentaron detención del crecimiento pero no senescencia. Se comparó la expresión de estos marcadores con la expresión cuando se cultivaron células en condiciones de inducción de diferenciación en adipocitos (21). Ninguno de estos marcadores aumentó en los cultivos tratados con PD0332991 (figura 11), aunque aumentaron cuando se cultivaron las células en condiciones de inducción de diferenciación. De manera similar, la tinción con aceite rojo O, que detecta gotas de lípidos, tampoco aumentó por PD0332991 en estas células y en LS8313 y LS7785-1. Por tanto, las células con crecimiento detenido que no lograron experimentar senescencia tras el tratamiento con PD0332991 no experimentaron diferenciación.

Por consiguiente, la inhibición de CDK4 puede inducir dos respuestas diferentes en líneas celulares de WD/DDLS positivas para RB caracterizadas por la amplificación de MDM2 y CDK4: una en la que las células experimentan detención del crecimiento y otra en la que la detención del crecimiento se asocia con la inducción de senescencia. Por simplicidad, se hace referencia a estos subgrupos como que no responden y que responden, respectivamente.

La reducción de la proteína CDK4 imita el efecto de PD0332991 en líneas celulares de liposarcoma positivas para RB. Para abordar la especificidad del efecto de PD0332991, también se redujo la expresión de la proteína CDK4 en dos líneas celulares que responden (LS8817 y LS0082) y dos líneas celulares que no responden (LS8107 y LS7785-1) usando dos ARNhp que codifican para lentivirus independientes (figura 3A). La reducción de CDK4 imitaba la respuesta celular a la inhibición de CDK4; se muestran datos representativos para una de las horquillas en las figuras 3A-D. En estas cuatro líneas celulares, la supresión de la expresión de CDK4 redujo la incorporación de BrdU (figura 3B) y disminuyó el nivel de ciclina A y fosfo-RB, lo que indica que las células experimentaron una detención de G1 (figura 3A). Los niveles de p53 y ARF disminuyeron de manera equivalente tanto en las líneas celulares que responden como en las que no responden y los niveles de p16 se mantuvieron altos (figura 3A). Mientras que todas las líneas celulares experimentaron una detención del crecimiento, la tinción con SA- β -gal y SAHF se acumularon significativamente sólo en las líneas celulares que responden (figuras 3C y 3D). La reducción de la expresión de CDK6, otra diana de PD0332991, en dos líneas celulares que responden (LS8817 y LS0082) con ARNhp solo redujo moderadamente la proliferación, ciclina A, fosfo-Rb, y no indujo la acumulación de SA- β -gal o SAHF (figuras 12A-E). Esto indicó la importancia de CDK4 para suprimir la senescencia en algunas de las líneas celulares de WD/DDLS.

Los cambios en la expresión de MDM2 se asociaron con el efecto promotor de la senescencia de PD0332991. También se examinó si la expresión de MDM2 podría ser un determinante del tipo que responden a PD0332991. Se examinaron los niveles de MDM2 en células que responden y que no responden tratadas con PD0332991. MDM2 se redujo aproximadamente tres veces en las células que responden tratadas con PD0332991 (LS8817 y LS0082) que experimentaron senescencia y no lo hicieron en las que no responden (LS8107 y LS7785-1)

que experimentaron detención del crecimiento (figura 5A). Se observaron resultados similares con las células que responden LS141 y las células que no responden LS7785-10 (figura 25B) y LS8313. Además, los niveles de MDM2 se redujeron mediante el silenciamiento de CDK4 en las células que responden pero no en las que no responden (figura 5A). Los niveles de MDM2 no se redujeron mediante el silenciamiento de CDK6 (figura 12A). En las células que responden, los niveles de MDM2 no estaban regulados de manera dependiente del crecimiento o del suero (datos no publicados).

Estos datos sugirieron una relación entre la actividad de CDK4, los niveles de MDM2 y la senescencia, respaldada adicionalmente cuando se caracterizó otra línea celular, LS6736, que tenía amplificación de MDM2 pero no de CDK4 (figura 8). La expresión de MDM2 fue notablemente baja en estas células, especialmente en comparación con las otras líneas celulares que estaban usándose (datos no mostrados). Estas células crecieron escasamente, y hubo un porcentaje extraordinariamente alto de células positivas para SA- β -gal y SAHF (HP1 β) incluso en ausencia de PD0332991 (figuras 14A y B). La adición de PD0332991 no aumentó adicionalmente el número de células positivas para SA- β -gal y SAHF (HP1 β). Se intentó infectar estas células con un lentivirus que expresa CDK4 para ver si eso aumentaría los niveles de MDM2 o reduciría el número de células que se tiñen positivamente para los focos de SA- β -gal o HP1 β , pero no se tuvo éxito en el aislamiento de transductantes.

Además, se examinaron los niveles de MDM2 en varias líneas celulares de cáncer en respuesta al tratamiento con PD0332991 (figura 15A y tabla 1). Para determinar si PD0332991 inducía senescencia en estas células, se midió la acumulación de β -galactosidasa asociada de manera perinuclear (SA- β -gal) (figura 15D) y la incorporación de BrdU (figura 15C). En cuatro líneas celulares (DKMG, SNB19, DBTRG-05MG y MCF7), se observó un aumento significativo del número de células de SA- β -gal siete días después de la exposición a PD0332991. Por el contrario, no se observó un aumento del número de células de SA- β -gal en la línea celular T98G después del tratamiento con PD0332991 (tabla 1). En las células de glioma (DKMG, SNB19 y DBTRG-05MG) y las células de cáncer de mama MCF (MCF7) que experimentaron senescencia en respuesta al tratamiento con PD0332991, los niveles de expresión de MDM2 se redujeron en más del 34% en comparación con las células no tratadas, independientemente del estado de p53 (figuras 15A y B). Los niveles de MDM2 no se vieron afectados en las células de glioma tratadas con PD0332991 (T98G) que no experimentaron senescencia (tabla 1).

Una diferencia clave entre las líneas celulares que responden y que no responden y aquellos pacientes que obtuvieron buenos resultados con PD0332991 y aquellos que no lo hicieron fue el nivel de MDM2 en las células tras el tratamiento farmacológico. Para determinar el mecanismo mediante el cual PD0332991 afectó a la expresión de MDM2, luego se examinó la acumulación de transcritos de *MDM2*. No hubo asociación entre la expresión de ARNm de *MDM2* y si respondían o no (figura 18C). A continuación, se midió el recambio de proteína MDM2 en células que no responden y que responden privadas de suero y tratadas con PD0332991. La semivida de la proteína MDM2 se redujo notablemente tras el tratamiento con PD0332991 en las células que responden en comparación con las células que no responden (figuras 18D y E). La privación de suero no aceleró el recambio en la misma medida. Por tanto, los mecanismos postraduccionales contribuyen al recambio en las células que responden tratadas con PD0332991.

Para determinar cómo contribuyó MDM2 al crecimiento de las líneas celulares de WD/DDLS, se trataron dos que responden (LS8817 y LS0082) y dos que no responden (LS8107 y LS7785-1) con nutlina 3a. Se espera que nutlina 3a aumente el nivel de estado estacionario de p53 y/o la actividad transcripcional de p53 al bloquear la interacción física entre p53 y MDM2. Tal como se esperaba las dianas de p53, MDM2 y p21, aumentaron en todas las líneas celulares tratadas con nutlina 3a (figura 13B) (22). El porcentaje de células apoptóticas teñidas con anexina V también aumentó (figura 13A). Por tanto, la nutlina 3a activa apoptosis tanto en células que responden como que no responden.

La inhibición de MDM2 mediada por ARNhp induce senescencia. Para evaluar directamente si la reducción de la expresión de MDM2 induciría senescencia, se transdujeron dos células que responden (LS8817 y LS0082) y dos que no responden (LS8107 y LS7785-1) con dos lentivirus que expresan ARNhp que seleccionaban como diana diferentes regiones del transcrito o un control reordenado (figura 4A). La cantidad de p53 no aumentó cuando se redujo MDM2 con dos lentivirus independientes que expresan ARNhp que seleccionaron como diana diferentes regiones del transcrito de MDM2 (figura 4A). La fosforilación de RB se redujo en todas las líneas celulares, indicativa de la detención del crecimiento (figura 4A). Los niveles de p53 y ARF no cambiaron, y los niveles de p16 permanecieron altos (figura 4A). Según la capacidad de MDM2 para bloquear la actividad transcripcional de p53, hubo un aumento de p21 tanto en células que responden como en que no responden; sin embargo, estas células no experimentaron apoptosis (datos no mostrados). Sorprendentemente, tanto SA- β -gal (figura 4B) como SAHF (figura 4C) se acumularon en células que responden y que no responden en las que MDM2 se había reducido, lo que indica que experimentaron senescencia. SAHF aumentó en todas las células, excepto LS7785-1, lo que concuerda con los informes de que no todas las células senescentes tienen la capacidad de formar tales focos (52, 53).

Para garantizar que la senescencia no fuera un efecto fuera de la diana del ARNhp, se expresó un alelo de titubeo ('wobbled') no seleccionable como diana de MDM2 en LS8817 y se examinó el efecto sobre la incorporación de BrdU y la aparición de SA- β -gal después de la transducción de ARNhp. El ARNhp dirigido contra MDM2 no pudo reducir la expresión de MDM2 en estas células (figura 4D) ni inducir senescencia (figura 4E). Por tanto, se concluyó que las células que no responden tienen la capacidad de activar un programa de senescencia, pero algo estaba

bloqueando su activación cuando PD0332991 indujo la detención del crecimiento en estas células. Además, la reducción de MDM2 fue suficiente para inducir detención del crecimiento y senescencia en las líneas celulares de WD/DDLS caracterizadas por la amplificación de CDK4 y MDM2.

- 5 Luego se planteó si la pérdida de MDM2 era necesaria para que la inhibición de CDK4 indujera senescencia. Para abordar esto, se forzó la expresión de un MDM2 silvestre (WT, *wild type*) a partir de un vector lentiviral y se midió su efecto sobre la senescencia inducida por PD0332991 en células LS8817. Como control también se expresó RFP. Después de seleccionar los transductantes durante cinco días, se trataron con PD0332991. La expresión ectópica de MDM2 impidió la reducción inducida por PD0332991 de la proteína MDM2 (figura 17). La salida del ciclo celular no se vio afectada ya que se redujo la incorporación de BrdU y ciclina A y Rb fosforilado (figura 17). Los niveles de Arf y p16 no aumentaron, sino que los niveles de p53 todavía se redujeron (figura 17), lo que indica que PD0332991 regula la acumulación de p53 en estas células independientemente de su efecto sobre MDM2. No obstante, SA-β-gal no pudo acumularse en las células con expresión forzada de MDM2 (figura 19A). La respuesta parcial observada a mayores concentraciones del fármaco refleja la heterogeneidad celular de los niveles de expresión de MDM2 en la reserva de transductantes (figura 5D). Curiosamente, la expresión ectópica de MDM2 reveló la pendiente de la respuesta, lo que sugiere que la senescencia fue un evento cooperativo que involucra probablemente bucles de realimentación cuya iniciación estuvo modulada por la expresión de MDM2 y refuerza la noción de que es el cambio en MDM2, en lugar del nivel absoluto de MDM2, lo que es fundamental para conducir las células a un estado senescente. Por tanto, se concluyó que la expresión de MDM2 elevada continuada en la célula quiescente podría interferir en la activación de un programa de senescencia.
- 10
- 15
- 20 Estos datos indicaron que era necesario reducir el nivel de MDM2 para la senescencia tras la detención del crecimiento inducida por PD0332991. No fue el nivel de MDM2 antes o después del tratamiento farmacológico lo que determinó la respuesta, sino que fue el cambio en MDM2 inducido por el fármaco lo que se asoció con la senescencia. Este cambio observado no está relacionado con el hecho de que estas células sobreexpresan diferentes cantidades de MDM2.
- 25 Tabla 1: Efecto de PD0332991 sobre la expresión de MDM2 y la acumulación de actividad β-galactosidasa asociada a senescencia en líneas celulares de glioma y cáncer de mama

Línea celular	Detención del crecimiento inducida por PD ³	SA-β-gal inducida por PD ⁴	βMDM2 con PD ⁵
DKMG ¹	+	S	0,66
SNB19 ¹	+	S	0,08
DBTRG-05MG ¹	+	S	0,49
T98G ¹	+	N	No detectado
MCF7 ²	+	S	0,08

¹Células de glioma

²Células de cáncer de mama

³La incorporación de BrdU se reduce al menos 8 veces 7 días después del tratamiento con el fármaco.

- 30 ⁴S, sí: el número de células SA-β-gal aumenta al menos 10 veces después de 7 días de tratamiento.

⁵La razón de MDM2 detectada mediante con ImageJ en cultivos tratados frente a no tratados

- 35 Los cambios inducidos por PD0332991 en la expresión de la proteína MDM2 están correlacionados con el desenlace del paciente. Como parte del reciente estudio de fase II de los presentes inventores (NCT01209598) que examina la respuesta de aproximadamente 40 pacientes a PD0332991, nueve dieron su consentimiento para biopsias previas y posteriores al tratamiento que permitió evaluar si los cambios en MDM2 estaban asociados con el desenlace clínico. Estos pacientes fueron positivos para RB mediante IHC y con amplificación de CDK4 mediante FISH. Estos pacientes se trataron con 125 mg de PD0332991 diariamente durante 21 días seguidos de siete días de descanso con ciclos que se repitieron cada cuatro semanas. Se tomaron biopsias previas al tratamiento antes de la primera dosis del fármaco, y se recogió una biopsia posterior al tratamiento o bien el día anterior al segundo ciclo (pacientes 2, 6, 8 y 9) o bien en el plazo de los seis días posteriores al inicio del segundo ciclo (pacientes 1, 3, 4, 5 y 7). Se evaluó la respuesta tumoral mediante tomografías computarizadas cada seis semanas durante 36 semanas y cada 12 semanas después de eso. Se agruparon los pacientes según su respuesta al fármaco según los criterios RECIST (51).

- 45 Se agruparon los pacientes según su mejor respuesta al fármaco según los criterios de Criterios de evaluación de respuesta a tumores sólidos (RECIST, por sus siglas en inglés). Por tanto, el crecimiento de las lesiones tumorales diana no se vio afectado en pacientes con progresión de la enfermedad (POD; empeoran), y se detuvo o redujo en pacientes con enfermedad estable (SD; permanecen igual) o respuesta parcial (PR; mejoran) (figura 7). Los niveles de MDM2 se redujeron en los pacientes 1, 4, 7 y 8 y no se vieron afectados en los pacientes 2, 3 y 9. No pudo

detectarse MDM2 o RB en extractos del paciente 6, aunque el paciente era positivo de manera inmunohistoquímica antes del inicio del ensayo. Debido a que no se pudo usar GAPDH para normalizar los niveles de MDM2 en los extractos del paciente 5, en su lugar se usó actina. Usando los criterios RECIST descritos anteriormente (51), cinco pacientes obtuvieron buenos resultados con el fármaco. A partir de marzo de 2013, uno de estos pacientes (paciente 1) logró una respuesta según RECIST ya que el tamaño tumoral disminuyó más del 60%. Dos pacientes con enfermedad progresiva fallecieron (pacientes 2 y 3) y dos más se retiraron del estudio (pacientes 6 y 9) debido a la carga tumoral creciente. Sólo se observaron cambios en MDM2 en asociación con una respuesta favorable (enfermedad estable o respuesta parcial) a PD0332991. Por tanto, los cambios en MDM2 se asociaron con una respuesta favorable a PD0332991.

PD0332991 activa la disociación de HAUSP de MDM2. Luego se planteó cómo PD0332991 reducía la expresión de MDM2. Se redujeron moderadamente los transcritos de MDM2 en cada línea celular por PD0332991 (figura 18C); sin embargo, la estabilidad de MDM2 se redujo notablemente tras el tratamiento con PD0332991 en las células que responden LS0082, LS141 y LS8817 y no se vio afectada en gran medida en las células que no responden LS7785-1 y LS7785-10 (figura 18D). La adición del inhibidor del proteasoma MG132 a las células LS8817 y LS141 tratadas con PD0332991 permitió la nueva acumulación de MDM2 (figura 21A). No se examinó el efecto sobre las células LS0082. Por tanto, PD0332991 activa un mecanismo dependiente del proteasoma postraducciona que reduce MDM2 en las células que responden.

La regulación postraducciona de MDM2 es compleja, desempeñando un papel tanto la autoubiquitinación dependiente de RING como las reacciones de transubiquitinación independientes de RING (61, 62). El mutante C464A de MDM2 puede ubiquitinarse en *trans* tanto por SCF-TrCP como por PCAF, pero no puede autoubiquitinarse (61-63). Por tanto, para plantearse si la autoubiquitinación contribuía al recambio de MDM2, se transfectaron células que responden LS8817 con MDM2 o bien marcado con etiqueta Flag o bien con el mutante C464A deficiente en ligasa E3 marcado con etiqueta Flag y se midió la estabilidad de las proteínas cuando se añadió PD0332991. PD0332991 no afectó a la estabilidad del mutante C464A, pero la proteína silvestre todavía se recambió (figura 21B). Por tanto, el recambio inducido por PD0332991 de MDM2 dependía de la autoubiquitinación.

La interacción de MDM2 con la desubiquitinasa HAUSP/USP7 es clave para inhibir el recambio de MDM2 (59, 60). Por tanto, se planteó si las diferencias en la interacción de HAUSP y MDM2 podrían contribuir a la estabilidad diferencial observada en las células que responden y que no responden. Se detectó la interacción de HAUSP y MDM2 mediante coimmunoprecipitación en células LS8817 y LS0082 (que responden) y LS7785-1 y LS7785-10 (que no responden) de crecimiento asincrónico no tratadas, pero no en ninguna de las células tratadas con PD0332991 (figura 25A). No se examinó esta interacción en las células LS141, LS8813 y LS8107. Los niveles de HAUSP no cambiaron tras el tratamiento con PD0332991 (figura 25B). Por tanto, la inhibición de CDK4 indujo la disociación de MDM2 y HAUSP independientemente de si la célula respondía o no.

Los datos anteriores sugirieron que o bien faltaba alguna actividad en las células que no responden o bien impedían el recambio de MDM2 mediante este mecanismo. De manera acorde con esto, el silenciamiento de HAUSP con dos horquillas lentivirales independientes en LS8107 que no responden no redujo los niveles de MDM2 (figura 25C) y el número de células positivas para SA- β -gal no aumentó (figura 25D). Estas células todavía experimentaron detención del crecimiento (datos no mostrados). La reducción de HAUSP en las células LS8817 fue suficiente para inducir la detención (datos no mostrados), reducir el nivel de MDM2 (figura 25C) y las células positivas para SA- β -gal se acumularon (figura 25D). Tomados en conjunto, estos datos indican que los inhibidores de CDK4 fomentan la disociación de HAUSP de MDM2; sin embargo, se requiere una etapa específica de tipo celular posterior para el recambio de MDM2.

6.3 DISCUSIÓN

WD/DDLS es uno de los tipos más comunes de sarcomas de tejidos blandos y es difícil de tratar cuando no es posible la resección quirúrgica, puesto que son relativamente resistentes a la quimioterapia convencional. El noventa por ciento (90%) de WD/DDLS tiene amplificación de genes en el segmento cromosómico 12q13-15, asociado con la sobreexpresión de los oncogenes MDM2 y CDK4. Esta región contiene dos amplicones de 12q distintos, uno que porta el oncogén MDM2 y otro que porta CDK4 (29). La naturaleza altamente recurrente de estas amplificaciones sugiere que una mayor comprensión de las rutas de señalización desreguladas controladas por MDM2 y CDK4 podría conducir al desarrollo de estrategias de tratamiento más eficaces en WD/DDLS.

En este ejemplo de trabajo, se demostró que la inhibición de la actividad de CDK4 en WD/DDLS conduce a la detención del crecimiento en todas las líneas celulares e induce senescencia en un subconjunto. La inducción de senescencia se asocia con disminuciones del nivel de MDM2 pero no con alteraciones en la expresión de p16, ARF o p53, reguladores canónicos del fenotipo senescente. Se induce senescencia cuando se inhibe MDM2 por el silenciamiento de ARNhp en todas las células cultivadas, lo que sugiere que la elevación continuada de MDM2 impide la senescencia en células quiescentes. De hecho, la expresión forzada de MDM2 inhibe la senescencia inducida por PD pero no su capacidad para inducir la detención del crecimiento.

La senescencia es una barrera temprana común frente a la oncogénesis (28, 30, 31). Los presentes resultados sugieren que la coamplificación de MDM2 y CDK4 tiene el efecto de suprimir esta respuesta. Se propone que

durante el inicio de esta enfermedad, un oncogén aún no identificado confiere la propensión de las células a la senescencia. La amplificación de MDM2 en 12q13-15 desempeña un papel que impide esto. Sin embargo, la amplificación no es suficiente para regular por incremento la cantidad de MDM2 en la célula, y se requiere la coamplificación de CDK4 para aumentar la expresión de MDM2 e inhibir la senescencia celular. La regulación por incremento dependiente de CDK4 de MDM2 puede explicar por qué estos dos genes se coamplifican con frecuencia, y la senescencia puede explicar por qué los tumores con amplificación de MDM2 pero no de CDK4 suelen tener una evolución clínica benigna (29).

Aunque proporciona información sobre los papeles que desempeñan MDM2 y CDK4 en la liposarcomagénesis, este trabajo también proporciona información sobre cómo la inhibición de CDK4 puede tener un beneficio clínico *in vivo*. En un estudio de fase I del inhibidor de CDK4/6 PD0332991, dos pacientes con WD/DDLS positivos para RB tenían enfermedad estable prolongada que duró varios años (32). Se han notificado los hallazgos de un ensayo de fase II que examina la seguridad y la eficacia del inhibidor de CDK4/6 PD0332991 en 30 pacientes con WD/DDLS (51). Los resultados de este ensayo muestran enfermedad estable prolongada en el 66% de los pacientes. Un paciente logró una respuesta parcial según RECIST a las 74 semanas. Otros tres pacientes tuvieron evidencia de una respuesta favorable al tratamiento que no cumplió con RECIST, específicamente, disminución del tamaño tumoral de al menos el 10%. El tratamiento con PD0332991 se toleró bien generalmente, aunque la mielosupresión fue común. Solo una minoría de pacientes requirió reducciones de dosis o retardos en la dosis. Los presentes datos indican que la diferencia en la respuesta inducida por PD0332991, con respecto a la senescencia o la detención del crecimiento, puede ser la base de la variación en la respuesta del paciente. Se ha propuesto que la senescencia es un criterio de valoración clínico favorable (28) y los presentes datos indican que los cambios en MDM2 se correlacionan con la respuesta del paciente al fármaco.

Es necesario realizar estudios correlativos adicionales que involucren a más pacientes con WD/DDLS y en otras enfermedades en las que PD0332991 ha tenido éxito, para ver cómo de universal podría ser esta relación. Los datos obtenidos del ensayo clínico de fase II de los presentes inventores muestran que los niveles reducidos de MDM2 tras el tratamiento con CDK4 están asociados con mejores desenlaces. Esto concuerda con la noción de que la senescencia es un desenlace clínico preferido y allana el camino para evaluar directamente esta hipótesis en futuros estudios de fase III de los presentes inventores que se iniciarán en breve. Por tanto, se mostró que la baja regulación de MDM2 activada por la inhibición de CDK4 activa una nueva ruta independiente de p53 que puede contribuir a la senescencia, tanto en las células en las que MDM2 se amplifica y la proteína se sobreexpresa como en aquellas en las que MDM2 no se amplifica ni se sobreexpresa.

6.4. Bibliografía

1. Jackman DM, Miller VA, Cioffredi LA, *et al.* Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer patients: results of an online tumor registry of clinical trials. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009; 15: 5267-73.
2. Janku F, Tsimberidou AM, Garrido-Laguna I, *et al.* PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors. *Molecular cancer therapeutics* 2011; 10: 558-65.
3. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, *et al.* Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007; 25: 3230-7.
4. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, *et al.* KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer* 2009; 101: 715-21.
5. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, *et al.* Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2009; 360: 1408-17.
6. Barretina J, Taylor BS, Banerji S, *et al.* Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nature genetics* 2010; 42: 715-21.
7. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews Cancer* 2009; 9: 153-66.
8. Ringshausen I, O'Shea CC, Finch AJ, Swigart LB, Evan GI. Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo. *Cancer cell* 2006; 10: 501-14.
9. McDuff FK, Turner SD. Jailbreak: oncogene-induced senescence and its evasion. *Cellular signalling* 2011; 23: 6-13.
10. Sperka T, Wang J, Rudolph KL. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 2012; 13: 579-90.

11. Secchiero P, Bosco R, Celeghini C, Zauli G. Recent advances in the therapeutic perspectives of Nutlin-3. *Current pharmaceutical design* 2011; 17: 569-77.
12. Cheek CF, Verma CS, Baselga J, Lane DP. Translating p53 into the clinic. *Nature reviews Clinical oncology* 2011; 8: 25-37.
- 5 13. Korotchkina LG, Leontieva OV, Bukreeva EI, Demidenko ZN, Gudkov AV, Blagosklonny MV. The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. *Aging* 2010; 2: 344-52.
14. Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, *et al.* Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular cancer therapeutics* 2004; 3: 1427-38.
- 10 15. Roberts PJ, Bisi JE, Strum JC, *et al.* Multiple roles of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 2012; 104: 476-87.
16. Johnson SM, Torrice CD, Bell JF, *et al.* Mitigation of hematologic radiation toxicity in mice through pharmacological quiescence induced by CDK4/6 inhibition. *The Journal of clinical investigation* 2010; 120: 2528-36.
17. Michaud K, Solomon DA, Oermann E, *et al.* Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. *Cancer research* 2010; 70: 3228-38.
- 15 18. Wiedemeyer WR, Dunn IF, Quayle SN, *et al.* Pattern of retinoblastoma pathway inactivation dictates response to CDK4/6 inhibition in GBM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 11501-6.
19. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88: 593-602.
- 20 20. Narita M, Nunez S, Heard E, *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003; 113: 703-16.
21. Halvorsen YD, Bond A, Sen A, *et al.* Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis. *Metabolism: clinical and experimental* 2001; 50: 407-13.
- 25 22. Singer S, Socci ND, Ambrosini G, *et al.* Gene expression profiling of liposarcoma identifies distinct biological types/subtypes and potential therapeutic targets in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Cancer research* 2007; 67: 6626-36.
23. Chan CH, Gao Y, Moten A, Lin HK. Novel ARF/p53-independent senescence pathways in cancer repression. *J Mol Med (Berl)* 2011; 89: 857-67.
- 30 24. Hsieh JK, Chan FS, O'Connor DJ, Mittnacht S, Zhong S, Lu X. RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Molecular cell* 1999; 3: 181-93.
25. Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, *et al.* Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 1995; 375: 694-8.
- 35 26. Yap DB, Hsieh JK, Chan FS, Lu X. mdm2: a bridge over the two tumour suppressors, p53 and Rb. *Oncogene* 1999; 18: 7681-9.
27. Knudsen ES, Buckmaster C, Chen TT, Feramisco JR, Wang JY. Inhibition of DNA synthesis by RB: effects on G1/S transition and S-phase progression. *Genes & development* 1998; 12: 2278-92.
28. Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature reviews Cancer* 2010; 10: 51-7.
- 40 29. Italiano A, Bianchini L, Gjernes E, *et al.* Clinical and biological significance of CDK4 amplification in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009; 15: 5696-703.
30. Campisi J. Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Current opinion in genetics & development* 2011; 21: 107-12.
- 45 31. Narita M, Lowe SW. Senescence comes of age. *Nature medicine* 2005; 11: 920-2.
32. Schwartz GK, LoRusso PM, Dickson MA, *et al.* Phase I study of PD 0332991, a cyclin-dependent kinase inhibitor, administered in 3-week cycles (Schedule 2/1). *British journal of cancer* 2011; 104: 1862-8.
33. Goentoro L, Kirschner MW. Evidence that fold-change, and not absolute level, of beta-catenin dictates Wnt

- signaling. *Molecular cell* 2009; 36: 872-84.
34. Campisi J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* 1997; 33: 703-9.
35. Courtois-Cox S, Jones SL, Cichowski K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* 2008; 27: 2801-9.
- 5 36. Prieur A, Besnard E, Babled A, Lemaître JM. p53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. *Nature communications* 2011; 2: 473.
37. Ramsey MR, Sharpless NE. ROS as a tumour suppressor? *Nature cell biology* 2006; 8: 1213-5.
38. Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature reviews Cancer* 2009; 9: 81-94.
- 10 39. Chicas A, Wang X, Zhang C, *et al.* Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer cell* 2010; 17: 376-87.
40. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes & development* 2010; 24: 2463-79.
41. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *The Journal of cell biology* 2011; 192: 547-56.
- 15 42. Capparelli C, Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, *et al.* CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, "fueling" tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis. *Cell Cycle* 2012; 11: 3599-610.
43. Puyol M, Martin A, Dubus P, *et al.* A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. *Cancer cell* 2010; 18: 63-73.
- 20 44. Rane SG, Cosenza SC, Mettus RV, Reddy EP. Germ line transmission of the Cdk4(R24C) mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence. *Molecular and cellular biology* 2002; 22: 644-56.
45. Adams PD. Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence. *Molecular cell* 2009; 36: 2-14.
- 25 46. Anders L, Ke N, Hydrbring P, *et al.* A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. *Cancer cell* 2011; 20: 620-34.
47. Taylor BS, Barretina J, Socci ND, *et al.* Functional copy-number alterations in cancer. *PLoS one* 2008; 3: e3179.
48. Zezula J, Casaccia-Bonnel P, Ezhevsky SA, *et al.* p21cip1 is required for the differentiation of oligodendrocytes independently of cell cycle withdrawal. *EMBO reports* 2001; 2: 27-34.
- 30 49. Ciznadija D, Zhu XH, Koff A. Hdm2- and proteasome-dependent turnover limits p21 accumulation during S phase. *Cell Cycle* 2011; 10: 2714-23.
50. Iwakuma T and Lozano G. MDM2, An Introduction. *Mol. Cancer Research* 2003; 1: 993-1000.
51. Dickson MA, Tap, WD, Keohan ML, *et al.* Phase II Trial of the CDK4 Inhibitor PD0332991 in Patients With Advanced CDK4-Amplified Well-Differentiated or Dedifferentiated Liposarcoma. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31(16): 2024-8.
- 35 52. Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., and Bartek, J. (2011). Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16(ink4a). *Cell Cycle* 10, 457-468.
53. Lawless, C., Wang, C., Jurk, D., Merz, A., Zglinicki, T., and Passos, J. F. (2010). Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp Gerontol* 45, 772-778.
- 40 54. Coppe, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5, 99-118.
55. Davalos, A. R., Coppe, J. P., Campisi, J., and Desprez, P. Y. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 29, 273-283.
56. Lujambio, A., Akkari, L., Simon, J., Grace, D., Tschaharganeh, D. F., Bolden, J. E., Zhao, Z., Thapar, V., Joyce, J. A., Krizhanovskiy, V., and Lowe, S. W. (2013). Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell* 153, 449-460.
- 45 57. Tchkonja, T., Zhu, Y., van Deursen, J., Campisi, J., and Kirkland, J. L. (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *The Journal of clinical investigation* 123, 966-972.

58. Aksoy, O., Chicas, A., Zeng, T., Zhao, Z., McCurrach, M., Wang, X., and Lowe, S. W. (2012). The atypical E2F family member E2F7 couples the p53 and RB pathways during cellular senescence. *Genes & development* 26, 1546-1557.
59. Brooks, C. L., Li, M., Hu, M., Shi, Y., and Gu, W. (2007). The p53-Mdm2-HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP. *Oncogene* 26, 7262-7266.
60. Li, M., Brooks, C. L., Kon, N., and Gu, W. (2004). A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Molecular cell* 13, 879-886.
61. Inuzuka, H., Tseng, A., Gao, D., Zhai, B., Zhang, Q., Shaik, S., Wan, L., Ang, X. L., Mock, C., Yin, H., *et al.* (2010). Phosphorylation by casein kinase I promotes the turnover of the Mdm2 oncoprotein via the SCF(beta-TRCP) ubiquitin ligase. *Cancer cell* 18, 147-159.
62. Jung, C. R., Lim, J. H., Choi, Y., Kim, D. G., Kang, K. J., Noh, S. M., and Im, D. S. (2010). Enigma negatively regulates p53 through MDM2 and promotes tumor cell survival in mice. *The Journal of clinical investigation* 120, 4493-4506. Knudsen, E. S., Buckmaster, C., Chen, T. T., Feramisco, J. R., and Wang, J. Y.
63. Linares, L. K., Kiernan, R., Triboulet, R., Chable-Bessia, C., Latreille, D., Cuvier, O., Lacroix, M., Le Cam, L., Coux, O., and Benkirane, M. (2007). Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nature cell biology* 9, 331-338.

7. EJEMPLO 2: LA SENESCENCIA INDUCIDA POR LA INHIBICIÓN DE CDK4 MODULA LA FOSFORACIÓN DE RB

7.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de líneas celulares, diferenciación y validación. Se desarrollaron líneas celulares a partir de tumores de WD/DDLS resecados de pacientes quirúrgicos después de obtener el consentimiento informado. LS8817 y LS0082 se han descrito previamente usando la nomenclatura DDLS8817 y WD0082. Se extrajo ADN de las líneas celulares usando protocolos habituales (QIAGEN DNEasy) y se confirmó el linaje mediante un alineamiento de número de copias para confirmar la amplificación del segmento 12q13-15 (Agilent 244K según las especificaciones del fabricante). Se realizó el análisis de los datos comparativos de hibridación genómica usando una cartera personalizada, que realiza la segmentación binaria circular habitual de la biblioteca de copias de ADN R/bioconductor y procesa todas las muestras con el algoritmo RAE (Taylor *et al.*, 2008).

Se mantuvieron las líneas celulares en DME HG complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10% y L-glutamina 2 mM. Se extrajo ARN de las células (RNEasy, QIAGEN) y se realizó transcripción inversa (Singer *et al.*, 2007) después del tratamiento durante 7 días con PD0332991 (Selleckchem) o medios de diferenciación tal como se describió previamente (Halvorsen *et al.*, 2001).

Análisis del ciclo celular. Se suministraron ARNhp en el vector pLKO.1 (Sigma) y se seleccionaron células infectadas usando puromicina (1 μ g/ml); se usó como control la infección con un virus que porta un control de reordenamiento (CAACAAGATGAAGAGCACCAA) en todos los experimentos que usan ARNhp. Se trataron líneas celulares con PD0339221 o ARNhp dirigido contra CDK4 (GAGATTCTTGCTGCCTTAA (SEQ ID NO: 4)), MDM2 (M376, TTCACTATCCACTACCAAAG (SEQ ID NO: 5); M380, TACTAGAAGTTGATGGCTGAG (SEQ ID NO: 6)), CCAGCTAAGTATCAAAGGAAA (SEQ ID NO: 7); 845, CGTGGTGTCAAGGTGTACTAA (SEQ ID NO: 8)) o CDK6 (GACCTGGAAAGGTGCAAAGAA (SEQ ID NO: 9)) durante de 48 horas a 7 días y se tiñeron con BrdU (20 μ M durante dos horas) o anexina V tal como se describió previamente (Singer *et al.*, 2007; Zezula *et al.*, 2001). Se determinó el contenido de G0 mediante tinción con yoduro de propidio y análisis mediante FACS (Ciznadija *et al.*, 2011).

Para la expresión de MDM2 y Rb, se infectaron células con un lentivirus (pLOC, Open Biosystems) que codifica para cualquiera de MDM2, MDM2 V75A, MDM2 I440A, MDM2 C464A, MDM2 Δ 254-264, MDM2 L468A, MDM2 Δ 464-471, MDM2 P476A, RB, LP-RB, PSM-RB o RFP. Se seleccionaron las células transducidas en medios que contenían blasticidina 3 μ g/ml y se mantuvo la selección durante todo el experimento.

Análisis de senescencia. Se sembraron células en placa a una concentración de 25.000 por pocillo en portaobjetos de cámara de 4 pocillos (Lab-Tek) y se trataron durante siete días con fármaco y se tiñeron para β -galactosidasa asociada a senescencia (kit de señalización celular #9860). Se cuantificó el número de células mediante tinción con DAPI y se cuantificó la tinción con β -galactosidasa como una proporción de las células totales.

Se cuantificaron los focos heterocromáticos asociados a senescencia después de que las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Tritón al 0,1%, se bloquearon con FBS al 2% y se tiñeron con anticuerpos contra HP1 α (dilución 1:5000, 2MOD-1G6 Millipore). Se identificaron células senescentes mediante inmunofluorescencia después del tratamiento de portaobjetos con anticuerpos secundarios anti-ratón y cuantificación de SAHF focal como porcentaje de las células totales (microscopio confocal Upright Confocal SP5 de Leica).

Inmunotransferencia. Se obtuvieron anticuerpos contra CDK4 (3F121), MDM2 (SMP-14), RB total (IF8), ciclina A (H432), p16 (C20) y p53 (Bp53-12), de Santa Cruz Biotechnology, fosfo-Rb 780 (#9307) de Cell Signaling y ARF (3642) de Abcam. Las células tratadas se lisaron con tampón que se componía de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, NP40 al 0,5%, PMSF 2 mM, y complementado con inhibidores de proteasa. Se resolvieron ochenta microgramos de proteína mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Se incubaron las membranas durante la noche con anticuerpos (1:1000).

Se prepararon extractos a partir de biopsias previas al tratamiento en el plazo de un periodo de dos semanas antes de la primera dosis del fármaco y biopsias posteriores al tratamiento en el plazo de los 7-10 días después de tres semanas de tratamiento. Se prepararon extractos en Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,25% y complementado con cóctel de inhibidor de mini-proteasa (Roche). Se evaluó la respuesta tumoral por el radiólogo de referencia mediante TAC cada seis semanas durante 36 semanas, y luego cada 12 semanas. El ensayo clínico estuvo aprobado por la Junta de Revisión Institucional del Centro de Cáncer Memorial Sloan-Kettering y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito (NCT01209598).

Rescate de titubeo. En primer lugar, se infectaron células con un lentivirus (pLOC, Open Biosystems) que codifica para o bien para un casete de expresión de *MDM2* que contiene la secuencia de apareamiento erróneo (ACTATTCTCAACCCTCAACTTCTA (SEQ ID NO: 10)) o bien un casete *RFP*. 24 horas después, se seleccionaron las células transducidas en medios que contenían blasticidina 3 μ g/ml y se mantuvo la selección durante todo el experimento. Cinco días después de que comenzara la selección con blasticidina, se transdujeron las células con un segundo vector lentiviral que codifica para la secuencia *shM380* que selecciona como diana MDM2 o una secuencia reordenada (*shSCR*) tal como se describió anteriormente. 24 horas después, estas células se seleccionaron en medios que contenían tanto blasticidina como puomicina 3 mg/ml.

7.2 RESULTADOS

La senescencia inducida por PD0332991 es independiente de p53 e INK4A. MDM2 es más conocido como regulador negativo de p53, que tanto afecta a su actividad transcripcional como cataliza su ubiquitinación y recambio (Haupt *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997; Momand *et al.*, 1992; Oliner *et al.*, 1993). Por tanto, se examinó el efecto de PD0332991, el silenciamiento de CDK4, la expresión de PSM-Rb, el silenciamiento de MDM2 y el silenciamiento de CDK6 sobre la acumulación de p53. Notablemente, los niveles de p53 estaban disminuidos con el tratamiento con PD0332991 (figura 2D), y en las células en las que CDK4 se redujo mediante silenciamiento (figura 3A), independientemente de si eran células que responden o que no responden. No pudo detectarse ningún aumento de p53 cuando se evaluaron la acumulación y localización de proteínas con varias condiciones de extracción diferentes y varios anticuerpos diferentes para la transferencia (por ejemplo, se prepararon extractos en tampones SDS-RIPA para la figura 22). Por otro lado, los niveles de p53 no se redujeron en el silenciamiento de MDM2 (figura 4A) o en células que expresan PSM-Rb (figura 6B), o en células en las que se silenció CDK6 (figura 12A). Existen múltiples rutas mediante las cuales las células pueden volverse senescentes, algunas de las cuales dependen de p53 y otras son independientes de p53 (Campisi, 1997; Courtois-Cox *et al.*, 2008; Kuilman *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2010; Prieur *et al.*, 2011; Ramsey y Sharpless, 2006). Sin embargo, debido a que era tan sorprendente que rutas que involucran MDM2 pudieran ser independientes de p53, se investigó esto más a fondo.

Para determinar si p53 era importante para la senescencia inducida por el silenciamiento de o bien PD0332991 o bien MDM2 en células LS8817, se redujo el nivel de p53 con dos ARNhp independientes en estas células. Aunque ambos ARNhp redujeron el nivel de p53, uno tuvo un efecto más pronunciado sobre el nivel de estado estacionario de MDM2 que el otro (figura 26). Las células positivas para SA- β -gal todavía se acumulaban cuando las células deficientes en p53 se trataron con PD0332991 (figura 26) o cuando se silenció MDM2 (figura 26). Esto indica que la pérdida de MDM2 puede inducir senescencia de una manera independiente de p53. Además, PD0332991 indujo senescencia en células que responden en las que se redujo p53 mediante infección con vectores de expresión de ARNhp lentivirales que redujeron p53. Colectivamente, esto sugirió que MDM2 suprimió la senescencia de una manera independiente de p53. También se deseaba determinar si la senescencia inducida por PD0332991 dependía de los productos del locus INK4A, p16 y Arf. La senescencia inducida por PD0332991 no se vio afectada cuando se silenciaban estos productos génicos.

Sin embargo, un silenciamiento podría dejar una pequeña reserva de p53 biológicamente activa indetectable; por tanto, se deseaba una prueba "genética" más limpia de la dependencia de p53. Se tuvo en cuenta que las mutaciones de p53 y la pérdida de INK4 son bastante comunes en el glioma y el cáncer de mama (Dean *et al.*, 2012; Michaud *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2012; Thangavel *et al.*, 2011). Por tanto, se recogieron ocho líneas celulares, algunas de las cuales eran mutantes en el locus *p53* y/o *INK4*, y todos los cuales no expresan MDM2 en exceso, y se planteó si experimentaban senescencia cuando se trataban con PD0332991 tal como se indica, mediante la pérdida de ciclina A y/o una reducción de la fosforilación de RB (figura 19B). La expresión de RB total también se reduce en muchas de las células detenidas, pero no se prosiguió con esto. De manera acorde al estado mutacional notificado de p53, pudo detectarse p21 en las células U87MG, DBTRG-05MG, ZR-75-1 y MCF7 pero no en las células U251, SNB19 y MDA453 (figura 19B). T47D, que se notificó que tenía una mutación L194F en p53, todavía expresó p21. Todas las líneas celulares experimentaron senescencia medida mediante la acumulación de SA- β -gal (figura 19B). De manera similar a las presentes observaciones en las líneas celulares de WD/DDLS que responden, los niveles de MDM2 disminuyeron tras el tratamiento con PD0332991 (figura 19B). Por tanto, también se observan

pérdida inducida por PD0332991 de MDM2 y senescencia en las líneas celulares de cáncer de mama y glioma. Aunque todas las líneas celulares de WD/DDLS tenían amplificación y sobreexpresión de MDM2, estas líneas celulares de mama y glioma no; por tanto, indicando que la senescencia inducida por la inhibición de CDK4 no dependía de altos niveles de MDM2. Por tanto, esta ruta de senescencia independiente de p53 e INK4A, dependiente de MDM2 activada por la inhibición de CDK4 opera en múltiples tipos de células, incluidas aquellas en las que *MDM2* no se amplifica. Luego se planteó si el silenciamiento de MDM2 también induciría senescencia en células SNB19 y MCF7, un glioma mutante para p53 y un cáncer de mama silvestre para p53. En ambos casos, las células experimentaron senescencia (figura 27A).

Para confirmar adicionalmente que la interacción con p53 no se requería para que MDM2 impidiese la senescencia, se comparó la capacidad de un V75A que perturba la unión de p53 (Moll y Petrenko, 2003) y MDM2 silvestre para bloquear la senescencia inducida por PD0332991. También se examinaron mutaciones de MDM2 que afectan sus funciones no relacionadas con p53 (Marine y Lozano, 2010), tales como las mutaciones C464A, I440A, L468A, P476A y \square 254-264. La mutación C464A perturba la estructura de refuerzo cruzado de RING y elimina la actividad ligasa E3 (Foo *et al.*, 2007; Wawrzynow *et al.*, 2007), y las mutaciones I440A, L468A y P476A eliminan la actividad ligasa E3, pero lo hacen perturbando selectivamente la unión de E2 (Mace *et al.*, 2008). La mutación \square 254-264 en el dominio ácido perturba múltiples interacciones de la proteína MDM2 (Sdek *et al.*, 2004). Como control, también se expresó la proteína fluorescente roja (RFP).

El mutante V75A pudo suprimir la acumulación inducida por PD0332991 de células positivas para SA- \square -gal (figura 19A), por tanto, reforzando la noción de que la senescencia inducida por PD0332991 era independiente de p53. Ninguno de los cuatro mutantes de RING examinados pudo suprimir la acumulación inducida por PD0332991 de células positivas para SA- \square -gal. Además, otro mutante que se solapa con RING pero que también afecta a la localización nucleolar (\square 464-471) no pudo suprimir la acumulación de células positivas para SA- \square -gal. Colectivamente, esto indicaba que la actividad ligasa E3 de MDM2 era necesaria para suprimir la senescencia y podría seleccionar como diana un sustrato que se una al dominio ácido, pero claramente no dependía de p53. Del mismo modo, V75A silvestre y mutante podían suprimir la acumulación inducida por PD0332991 de células SNB19 positivas para SA- \square -gal, pero el mutante C464A no pudo (figura 19C).

La reducción de SKP2 induce la detención del ciclo celular y puede activar una ruta de senescencia independiente de INK4A y p53 en células transformadas de manera oncogénica (Lin *et al.*, 2010). Dado que la activación de la ruta de SKP2 es esencial para ciclos celulares continuados, no era probable que fuera un determinante clave para determinar si una célula experimenta senescencia o quiescencia una vez que sale del ciclo celular. No obstante, para confirmar que la actividad del complejo de SKP2 no era diferente entre las células que responden y las que no responden, se examinó la expresión de p27, el sustrato mejor descrito de la ligasa SKP2 (Hershko, 2008; Wang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2004). Los niveles de p27 fueron idénticos en las células que responden y que no responden, y no cambiaron con el tratamiento con PD0332991 (figura 22). Por tanto, tal como se esperaba, esta ruta reprimida de MDM2 no estaba relacionada con la ruta reprimida de SCF^{skp2}.

La acumulación de RB no fosforilado es suficiente para fomentar la senescencia. Los programas de senescencia inducidos por PD0332991 o el silenciamiento de MDM2 no se asociaron con la acumulación de un programa de p53 transcripcionalmente activo robusto. En cambio, la acumulación de p53 transcripcionalmente activo condujo a apoptosis. Además, después de cambiar las condiciones de extracción y usar varios anticuerpos diferentes para p53 para la transferencia y localización mediante inmunofluorescencia, se descartó que las modificaciones o diferencias en la localización de p53 podrían explicar la aparente independencia de p53 de este proceso.

Puede inducirse senescencia activando la ruta de RB en ausencia de p53 (Sperka *et al.*, Nature reviews Molecular cell biology 2012; 13: 579-90; Chan *et al.*, J Mol Med (Berl) 2011; 89: 857-67) MDM2 puede interactuar con RB (Hsieh *et al.*, Molecular cell 1999; 3: 181-93; Xiao *et al.*, Nature 1995; 375: 694-8; Yap *et al.*, Oncogene 1999; 18: 7681-9), y podría impedir su capacidad de fomentar la senescencia. Para determinar si la acumulación de RB no fosforilado sería suficiente para inducir senescencia, se expresó el mutante de bolsillo grande no fosforilable de RB (PSM-Rb) (Knudsen *et al.*, 1998) en dos de las líneas celulares que responden, LS8817 y LS0082, y como control en una de las líneas celulares que no responden, LS7785-1. Como otro control, también se expresó el bolsillo grande silvestre (LP) que podría inactivarse por cinasas endógenas dependientes de ciclina. Tal como se esperaba, la proliferación se redujo significativamente mediante la expresión de PSM-Rb en las tres líneas celulares, pero no por LP (figura 6A). Los niveles de MDM2 se redujeron en las líneas celulares que responden pero no en las que no responden (figura 6A), y la tinción con SA- \square -gal (figura 6B) aumentó sólo en las líneas celulares que responden que expresan PSM-Rb y no en las que no responden. La fosforilación de la proteína RB endógena, aunque disminuyó en relación con las células de control, todavía se detectó, lo que indica que estas células con crecimiento detenido todavía tenían un mayor nivel de actividad de ciclina D1-cdk4 que las células de control tratadas con PD0332991 (figuras C y D).

También se indujo la detención de G0/G1 y se impidió la fosforilación de RB mediante privación de suero de dos líneas celulares que responden, LS141 y LS8817, y dos líneas celulares que no responden, LS8107 y LS7785-10 (figura 18) y se midió el efecto sobre la senescencia. La incorporación de BrdU se redujo, pero MDM2 no se redujo (figura 18A), ni aumentó el número de células positivas para SA- \square -gal (figura 18B). Esto indicó que la detención del crecimiento no fue suficiente para explicar la regulación de MDM2. No se detectó ninguna asociación entre la

expresión de catalasa (figura 22), un marcador de la ruta de ROS, o el reclutamiento de p53BP1 en cromatina, un marcador de la ruta de respuesta al daño del ADN con el estado de respuesta, lo que indica que la señalización mitogénica desequilibrada es el estrés que induce esta ruta.

5 Por tanto, al menos, en presencia de suero, la acumulación de RB no fosforilado en células que responden es suficiente para reducir la acumulación de MDM2 e inducir senescencia en un grado cuantitativamente similar a PD0332991, ARNhp dirigido contra CDK4 o ARNhp dirigido contra MDM2. Sin querer restringirse a una teoría particular, estos datos sugieren que hay un bucle de realimentación entre la inactivación de RB y los niveles de MDM2 que podrían iniciar y mantener las células en el estado senescente, que se perturbó en células que no responden.

10 7.3 DISCUSIÓN

La senescencia es una potente barrera frente a la formación de tumores, y desencadenar su reactivación en las células tumorales se considera una opción terapéutica viable. Sin embargo, la presente comprensión de las rutas a través de las cuales las células se vuelven senescentes todavía es inmadura. La mayoría de los desencadenantes, tales como el estrés oncogénico, la acumulación de especies reactivas de oxígeno o el daño en el ADN, conducen a la activación de las rutas de ARF-p53 y/o p16-RB, y cualquiera de los dos solo es suficiente para que las células experimenten senescencia (Campisi, 1997; Courtois-Cox *et al.*, 2008; Kuilman *et al.*, 2010; Ramsey y Sharpless, 2006). En común entre todas estas rutas es que la célula toma la decisión de continuar el ciclo o experimentar senescencia. Por otro lado, en el presente documento se presenta una nueva ruta hacia la senescencia, una que refleja una elección entre quiescencia o senescencia. Estudiar esta ruta de desarrollo única condujo a definir una ruta molecular igualmente única, una inducida por la inhibición de CDK4 y es independiente de p53 e INK4A.

Se identificó MDM2 como un actor crítico que suprime la senescencia en células que salieron del ciclo celular en respuesta a la inhibición de CDK4. La expresión de MDM2 continuada impide que las células quiescentes progresen a senescencia, y la reducción de MDM2 es suficiente para activar la ruta de senescencia. Esta ruta puede activarse en varios tipos de células, incluidos WD/DDLS en los que MDM2 se amplifica y se sobreexpresa, y aquellos en los que generalmente no se amplifica o se sobreexpresa, tales como cáncer de mama y el glioma. Esta ruta no se activa mediante privación de suero, inducción de p53 por nutlinas o daño en el ADN.

Es bastante interesante observar que la reducción de MDM2 de las células en ciclos a las que no lo hacen, en lugar del nivel absoluto de MDM2, es lo que activa la respuesta de senescencia. Este tipo de señal, en el que la célula lee el cambio en el nivel de la proteína frente a su nivel absoluto, está emergiendo como concepto de nivel de sistemas en otras rutas de señalización (Goentoro *et al.*, Molecular Cell 2009; 36: 872-84) Se propone amortiguar la respuesta celular con respecto a variaciones transitorias en la cantidad de proteína. Sin embargo, la cuestión de cómo logran las células tal medición todavía no está clara. Comprender por qué el nivel de MDM2 se altera mucho más en células que responden en comparación con las que no responden puede iluminar la presente comprensión de tales entradas reguladoras. Claramente, la acumulación de Rb no fosforilado en las células que responden es necesaria, pero no es suficiente porque la privación de suero induce detención con RB hipofosforilado pero no senescencia (datos no publicados), y RB no fosforilado solo no puede inducir senescencia en las células que no responden.

Además de las posibles implicaciones clínicas, este estudio también ha proporcionado una visión significativa e innovadora de los mecanismos moleculares mediante los cuales CDK4 y MDM2 inhiben la senescencia. Se induce senescencia en respuesta a muchos tipos de estrés celular (Campisi, Eur J Cancer 1997; 33: 703-9; Courtois-Cox *et al.*, Oncogene 2008; 27: 2801-9; Prieur *et al.*, Nature Communications 2011; 2: 473; Ramsey *et al.*, Nature cell biology 2006; 8: 1213-5). Se ha observado en el contexto de daño en el ADN, después de múltiples replicaciones celulares (envejecimiento), en presencia de altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) celulares y en asociación con la expresión aberrante de oncoproteínas tales como Ras^{V12} (Kuilman *et al.*, Nature reviews Cancer 2009; 9: 81-94). En la visión clásica de la senescencia, la respuesta al daño del ADN se activa por uno de estos eventos y provoca una cascada de señalización que culmina en la detención irreversible del ciclo celular. El proceso está mediado por p53 y RB o por rutas solapadas activadas por altos niveles de inhibidores de cinasa dependientes de ciclina (por ejemplo, p21, p16) o ARF (Campisi, Eur J Cancer 1997; 33: 703-9; Chicas *et al.*, Cancer cell 2010; 17: 376-87; Kuilman *et al.*, Genes & development 2010; 24: 2463-79; Rodier *et al.* The Journal of cell biology 2011; 192: 547-56). Sin embargo, el silenciamiento de la expresión de estas proteínas en las líneas celulares que responden no afectó a la capacidad de PD0332991 de provocar senescencia (datos no mostrados) argumentando en contra de un papel clave para ellos en este tipo de senescencia. Sin embargo, PSM-Rb activa la senescencia en células que responden, la sobreexpresión de CDK4 puede inhibir la senescencia inducida en fibroblastos, e inhibir CDK4 puede inducir senescencia en algunas líneas celulares de cáncer (Michaud *et al.*, Cancer research 2010; 70: 3228; Wiedemeyer *et al.*, 2010; 107: 11501-6; Capparelli *et al.*, Cell Cycle 2012; 11: 3599-610; Puyol *et al.*, Cancer cell 2010; 18: 63-73; y Rane *et al.*, Molecular and cellular biology 2002; 22: 644-56). Esto concuerda con un modelo en el que CDK4 inhibe la senescencia a través de su efecto canónico sobre la fosforilación de RB; inhibir esta cinasa permite que se acumule RB no fosforilado en los promotores de genes diana E2F y participe en la formación de focos heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF) (Narita *et al.*, Cell 2003; 113: 703-16; Adams *et al.*, Molecular cell 2009; 36: 2-14) que afecta a la expresión de MDM2.

60 No obstante, RB puede no ser la única diana mediante la cual CDK4 inhibe la senescencia. Múltiples dianas de

CDK4 pueden actuar conjuntamente para coordinar la respuesta. Por ejemplo, Anders *et al.* (Cancer cell 2011; 20: 620-34) determinaron que FOXM1 también es un sustrato de CDK4, y se requería FOXM1 para la inhibición de la senescencia dependiente de CDK4. El FOXM1 estable fomenta la expresión de genes del ciclo celular, un posible mecanismo mediante el cual contrarresta la senescencia. Múltiples dianas de CDK4 pueden actuar conjuntamente para coordinar la respuesta. Las presentes observaciones sugieren que un programa quiescente dependiente de CDK4 incide en una ruta de señalización sensible a los niveles de MDM2 en células quiescentes. Esto puede representar un nuevo mecanismo adicional mediante el cual CDK4 regula la senescencia. Si esta ruta está intacta o no, puede determinar la naturaleza de la respuesta de una célula a PD0332991.

Se han descrito otras rutas de senescencia que son independientes de p53 e INK4A (Lin *et al.*, 2010; Prieur *et al.*, 2011). Uno se activa por la pérdida de SKP2 (Lin *et al.*, 2010). Esta ruta es una situación clásica cuando las células se ven obligadas a salir del ciclo celular. Esto es lo que se esperaba para la senescencia inducida por la inhibición de CDK4 porque CDK4 controla la proliferación celular e impide la senescencia en otras circunstancias (Anders *et al.*, 2011; Puyol *et al.*, 2010; Rane *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2002). En cualquier caso, el escenario que se describe en este caso es que la célula elige entre quiescencia y senescencia, una opción de desarrollo diferente con un mecanismo molecular diferente.

Otra ruta se activa por la pérdida de la histona acetil transferasa p300 (Prieur *et al.*, 2011). La cantidad de p300 se reduce en una variedad de circunstancias que inducen senescencia, incluyendo la sobreexpresión de ras oncogénico. En todos los casos, se observa hipoacetilación de histona H3/H4 y la reducción de p300 también puede conducir a esto. Este es probablemente un efecto posterior de muchas rutas, ya que se relaciona con el estado de condensación de cromatina en las células senescentes.

No se comprende completamente cómo las células eligen entre los estados quiescentes y senescentes. La señalización de TOR puede afectar a esta elección al alterar la salida del programa de p53 (Korotchkina *et al.*, 2010; Leontieva y Blagosklonny, 2013). En cambio, la ruta activada por la pérdida de MDM2 descrita en este caso es claramente independiente de p53. Se determinó que (i) la proteína p53 estaba reducida en estas células senescentes, (ii) el silenciamiento de p53 no afectaba a la senescencia, (iii) se indujo la senescencia de las células con mutaciones en p53 mediante inhibición de CDK4 o reducción de MDM2, y (iv) podía impedirse la senescencia mediante la expresión ectópica de una proteína MDM2 que no puede unirse a p53. La respuesta de p53 en estas células no es atípica, porque la irradiación o el tratamiento de estas células con nutlina 3a activa la detención del crecimiento, la acumulación de p53 y la apoptosis (Ambrosini *et al.*, 2007; Singer *et al.*, 2007). De hecho, la doxorubicina puede inducir la acumulación de p53 y la entrada de las células LS8817 en la senescencia sin una reducción de los niveles de MDM2.

La minería de bases de datos (Jensen *et al.*, 2009; Stark *et al.*, 2011) indicó que MDM2 puede interactuar con varias enzimas de remodelación de cromatina tales como PCAF, YY1 y HDAC1 y estas también pueden participar. Aunque se han descrito varias proteínas de unión a MDM2 tal como se indicó anteriormente, solo los reguladores apoptóticos p53, CAS y HUWE1 se han definido como sustratos (Kurokawa *et al.*, 2013; Marine y Lozano, 2010).

La inhibición de CDK4 es suficiente para activar la regulación por disminución de MDM2 en algunas líneas celulares pero no en otras. La regulación por disminución se asocia con un aumento del recambio y requiere la actividad ligasa E3 intrínseca de MDM2. La desubiquitinasa USP7/HAUSP es el principal mecanismo regulador que controla el recambio de MDM2 por esta ruta. Sin embargo, a las células que no responden o bien les faltaba un factor adicional crítico o bien habían evolucionado una forma de impedir el recambio inducido por la pérdida de la interacción o incluso la regulación por disminución de HAUSP con ARNhp.

Por consiguiente, al tratar de identificar la naturaleza de la resistencia intrínseca a los inhibidores de CDK4, se halló una nueva ruta que regula si una célula se vuelve quiescente o senescente. Se estableció que MDM2 es un actor clave en esta ruta. Curiosamente, se demostró que esta ruta es independiente de p53 e INK4 y que depende de la actividad ligasa E3 de MDM2.

7.4. Bibliografía

Adams, P. D. (2009). Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence. *Molecular cell* 36, 2-14.

Ambrosini, G., Sambol, E. B., Carvajal, D., Vassilev, L. T., Singer, S., and Schwartz, G. K. (2007). Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene* 26, 3473-3481.

Barretina, J., Taylor, B. S., Banerji, S., Ramos, A. H., Lagos-Quintana, M., Decarolis, P. L., Shah, K., Socci, N. D., Weir, B. A., Ho, A., *et al.* (2010). Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nature genetics* 42, 715-721.

Brooks, C. L., and Gu, W. (2009). How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nature reviews Cancer* 9, 123-128.

- Campisi, J. (1997). The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* 33, 703-709.
- Campisi, J. (2011). Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Current opinion in genetics & development* 21, 107-112.
- 5 Chappell, W. H., Steelman, L. S., Long, J. M., Kempf, R. C., Abrams, S. L., Franklin, R. A., Basecke, J., Stivala, F., Donia, M., Fagone, P., *et al.* (2011). Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2, 135-164.
- Chicas, A., Wang, X., Zhang, C., McCurrach, M., Zhao, Z., Mert, O., Dickins, R. A., Narita, M., Zhang, M., and Lowe, S. W. (2010). Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer cell* 17, 376-387.
- 10 Ciznadija, D., Zhu, X. H., and Koff, A. (2011). Hdm2- and proteasome-dependent turnover limits p21 accumulation during S phase. *Cell Cycle* 10, 2714-2723.
- Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature reviews Cancer* 10, 51-57.
- Coppe, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5, 99-118.
- 15 Courtois-Cox, S., Jones, S. L., and Cichowski, K. (2008). Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* 27, 2801-2809.
- Davalos, A. R., Coppe, J. P., Campisi, J., and Desprez, P. Y. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 29, 273-283.
- 20 Dean, J. L., McClendon, A. K., Hickey, T. E., Butler, L. M., Tilley, W. D., Witkiewicz, A. K., and Knudsen, E. S. (2012). Therapeutic response to CDK4/6 inhibition in breast cancer defined by ex vivo analyses of human tumors. *Cell Cycle* 11, 2756-2761.
- Dickson, M. A., Tap, W. D., Keohan, M. L., D'Angelo, S. P., Gounder, M. M., Antonescu, C. R., Landa, J., Qin, L. X., Rathbone, D. D., Condy, M. M., *et al.* (2013). Phase II trial of the CDK4 inhibitor PD0332991 in patients with advanced CDK4-amplified well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, 2024-2028.
- 25 Favaro, E., Bensaad, K., Chong, M. G., Tennant, D. A., Ferguson, D. J., Snell, C., Steers, G., Turley, H., Li, J. L., Gunther, U. L., *et al.* (2012). Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells. *Cell Metab* 16, 751-764.
- 30 Foo, R. S., Chan, L. K., Kitsis, R. N., and Bennett, M. R. (2007). Ubiquitination and degradation of the anti-apoptotic protein ARC by MDM2. *The Journal of biological chemistry* 282, 5529-5535.
- Fry, D. W., Harvey, P. J., Keller, P. R., Elliott, W. L., Meade, M., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X., Leopold, W. R., Pryer, N. K., and Toogood, P. L. (2004). Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular cancer therapeutics* 3, 1427-1438.
- 35 Guha, M. (2013). Blockbuster dreams for Pfizer's CDK inhibitor. *Nat Biotechnol* 31, 187.
- Halvorsen, Y. D., Bond, A., Sen, A., Franklin, D. M., Lea-Currie, Y. R., Sujkowski, D., Ellis, P. N., Wilkison, W. O., and Gimble, J. M. (2001). Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis. *Metabolism: clinical and experimental* 50, 407-413.
- 40 Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.
- Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420, 25-27.
- Hsieh, J. K., Chan, F. S., O'Connor, D. J., Mitnacht, S., Zhong, S., and Lu, X. (1999). RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Molecular cell* 3, 181-193.
- 45 Jackman, D. M., Miller, V. A., Cioffredi, L. A., Yeap, B. Y., Janne, P. A., Riely, G. J., Ruiz, M. G., Giaccone, G., Sequist, L. V., and Johnson, B. E. (2009). Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer patients: results of an online tumor registry of clinical trials. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 5267-5273.
- 50 Janku, F., Tsimberidou, A. M., Garrido-Laguna, I., Wang, X., Luthra, R., Hong, D. S., Naing, A., Falchook, G. S., Moroney, J. W., Piha-Paul, S. A., *et al.* (2011). PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with

- PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors. *Molecular cancer therapeutics* 10, 558-565.
- Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., *et al.* (2009). STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic acids research* 37, D412-416.
- 5 Jiang, P., Du, W., Mancuso, A., Wellen, K. E., and Yang, X. (2013). Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature* 493, 689-693.
- Jones, K., Timchenko, L., and Timchenko, N. A. (2012). The role of CUGBP1 in age-dependent changes of liver functions. *Ageing Res Rev* 11, 442-449.
- 10 Khambata-Ford, S., Garrett, C. R., Meropol, N. J., Basik, M., Harbison, C. T., Wu, S., Wong, T. W., Huang, X., Takimoto, C. H., Godwin, A. K., *et al.* (2007). Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, 3230-3237.
- Knudsen, E. S., Buckmaster, C., Chen, T. T., Feramisco, J. R., and Wang, J. Y. (1998). Inhibition of DNA synthesis by RB: effects on G1/S transition and S-phase progression. *Genes & development* 12,2278-2292.
- 15 Korotchkina, L. G., Leontieva, O. V., Bukreeva, E. I., Demidenko, Z. N., Gudkov, A. V., and Blagosklonny, M. V. (2010). The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. *Aging* 2, 344-352.
- Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., and Bartek, J. (2011). Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16(ink4a). *Cell Cycle* 10, 457-468.
- 20 Kubbutat, M. H., Jones, S. N., and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes & development* 24, 2463-2479.
- Kuilman, T., and Peeper, D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature reviews Cancer* 9, 81-94.
- 25 Lawless, C., Wang, C., Jurk, D., Merz, A., Zglinicki, T., and Passos, J. F. (2010). Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp Gerontol* 45, 772-778.
- Leach, F. S., Tokino, T., Meltzer, P., Burrell, M., Oliner, J. D., Smith, S., Hill, D. E., Sidransky, D., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). p53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer research* 53, 2231-2234.
- 30 Li, Q., and Lozano, G. (2013). Molecular pathways: targeting Mdm2 and Mdm4 in cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 34-41.
- Loupakis, F., Ruzzo, A., Cremolini, C., Vincenzi, B., Salvatore, L., Santini, D., Masi, G., Stasi, I., Canestrari, E., Rulli, E., *et al.* (2009). KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer* 101, 715-721.
- 35 Lujambio, A., Akkari, L., Simon, J., Grace, D., Tschaharganeh, D. F., Bolden, J. E., Zhao, Z., Thapar, V., Joyce, J. A., Krizhanovskiy, V., and Lowe, S. W. (2013). Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell* 153, 449-460.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews Cancer* 9, 153-166.
- 40 Marine, J. C., and Lozano, G. (2010). Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell Death Differ* 17, 93-102.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Montalto, G., Cervello, M., Nicoletti, F., Fagone, P., Malaponte, G., Mazzarino, M. C., *et al.* (2012). Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget* 3, 954-987.
- 45 McDuff, F. K., and Turner, S. D. (2011). Jailbreak: oncogene-induced senescence and its evasion. *Cellular signalling* 23, 6-13, Michaud, K., Solomon, D. A., Oermann, E., Kim, J. S., Zhong, W. Z., Prados, M. D., Ozawa, T., James, C. D., and Waldman, T. (2010). Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. *Cancer research* 70, 3228-3238.
- Miller, K. R., Kelley, K., Tuttle, R., and Berberich, S. J. (2010). HdmX overexpression inhibits oncogene induced cellular senescence. *Cell Cycle* 9, 3376-3382.

- Moll, U. M., and Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* 1, 1001-1008.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-1245.
- 5 Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.
- Oliner, J. D., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362, 857-860.
- 10 Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioco, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P., and Pelicci, P. G. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406, 207-210.
- Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., and Lemaître, J. M. (2011). p53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. *Nature communications* 2, 473.
- 15 Puyol, M., Martin, A., Dubus, P., Mulero, F., Pizcueta, P., Khan, G., Guerra, C., Santamaria, D., and Barbacid, M. (2010). A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. *Cancer cell* 18, 63-73.
- Quijano, C., Cao, L., Fergusson, M. M., Romero, H., Liu, J., Gutkind, S., Rovira, I., Mohny, R. P., Karoly, E. D., and Finkel, T. (2012). Oncogene-induced senescence results in marked metabolic and bioenergetic alterations. *Cell Cycle* 11, 1383-1392.
- 20 Ramsey, M. R., and Sharpless, N. E. (2006). ROS as a tumour suppressor? *Nature cell biology* 8, 1213-1215.
- Rane, S. G., Cosenza, S. C., Mettus, R. V., and Reddy, E. P. (2002). Germ line transmission of the Cdk4(R24C) mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence. *Molecular and cellular biology* 22, 644-656.
- Rayess, H., Wang, M. B., and Srivatsan, E. S. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International journal of cancer Journal international du cancer* 130, 1715-1725.
- 25 Ringshausen, I., O'Shea, C. C., Finch, A. J., Swigart, L. B., and Evan, G. I. (2006). Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo. *Cancer cell* 10, 501-514.
- Roberts, P. J., Bisi, J. E., Strum, J. C., Combest, A. J., Darr, D. B., Usary, J. E., Zamboni, W. C., Wong, K. K., Perou, C. M., and Sharpless, N. E. (2012). Multiple roles of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 104, 476-487.
- 30 Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *The Journal of cell biology* 192, 547-556.
- Salomoni, P., and Pandolfi, P. P. (2002). The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108, 165-170.
- Scaglioni, P. P., Rabellino, A., Yung, T. M., Bernardi, R., Choi, S., Konstantinidou, G., Nardella, C., Cheng, K., and Pandolfi, P. P. (2012). Translation-dependent mechanisms lead to PML upregulation and mediate oncogenic KRAS-induced cellular senescence. *EMBO Mol Med* 4, 594-602.
- 35 Schwartz, G. K., LoRusso, P. M., Dickson, M. A., Randolph, S. S., Shaik, M. N., Wilner, K. D., Courtney, R., and O'Dwyer, P. J. (2011). Phase I study of PD 0332991, a cyclin-dependent kinase inhibitor, administered in 3-week cycles (Schedule 2/1). *British journal of cancer* 104, 1862-1868.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- 40 Singer, S., Socci, N. D., Ambrosini, G., Sambol, E., Decarolis, P., Wu, Y., O'Connor, R., Maki, R., Viale, A., Sander, C., *et al.* (2007). Gene expression profiling of liposarcoma identifies distinct biological types/subtypes and potential therapeutic targets in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Cancer research* 67, 6626-6636.
- Sperka, T., Wang, J., and Rudolph, K. L. (2012). DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 579-590.
- 45 Stark, C., Breitkreutz, B. J., Chatr-Aryamontri, A., Boucher, L., Oughtred, R., Livstone, M. S., Nixon, J., Van Auken, K., Wang, X., Shi, X., *et al.* (2011). The BioGRID Interaction Database: 2011 update. *Nucleic acids research* 39, D698-704.
- Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Kempf, R. C., Long, J., Laidler, P., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Stivala, F., Mazarino, M. C., *et al.* (2011). Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in

controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging* 3, 192-222.

Talluri, S., and Dick, F. A. (2012). Regulation of transcription and chromatin structure by pRB: here, there and everywhere. *Cell Cycle* 11, 3189-3198.

5 Taylor, B. S., Barretina, J., Socci, N. D., Decarolis, P., Ladanyi, M., Meyerson, M., Singer, S., and Sander, C. (2008). Functional copy-number alterations in cancer. *PloS one* 3, e3179.

Tchkonia, T., Zhu, Y., van Deursen, J., Campisi, J., and Kirkland, J. L. (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *The Journal of clinical investigation* 123, 966-972.

Teicher, B. A. (2012). Searching for molecular targets in sarcoma. *Biochem Pharmacol* 84, 1-10.

10 Thangavel, C., Dean, J. L., Ertel, A., Knudsen, K. E., Aldaz, C. M., Witkiewicz, A. K., Clarke, R., and Knudsen, E. S. (2011). Therapeutically activating RB: reestablishing cell cycle control in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Endocrine-related cancer* 18, 333-345.

Van Cutsem, E., Kohne, C. H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C. R., Makhson, A., D'Haens, G., Pinter, T., Lim, R., Bodoky, G., *et al.* (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 360, 1408-1417.

15 Varmeh, S., Egia, A., McGrouther, D., Tahan, S. R., Bayat, A., and Pandolfi, P. P. (2011). Cellular senescence as a possible mechanism for halting progression of keloid lesions. *Genes Cancer* 2, 1061-1066.

Wawrzynow, B., Zylicz, A., Wallace, M., Hupp, T., and Zylicz, M. (2007). MDM2 chaperones the p53 tumor suppressor. *The Journal of biological chemistry* 282, 32603-32612.

20 Wiedemeyer, W. R., Dunn, I. F., Quayle, S. N., Zhang, J., Chheda, M. G., Dunn, G. P., Zhuang, L., Rosenbluh, J., Chen, S., Xiao, Y., *et al.* (2010). Pattern of retinoblastoma pathway inactivation dictates response to CDK4/6 inhibition in GBM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11501-11506.

25 Wolynec, K., Shortt, J., de Stanchina, E., Levav-Cohen, Y., Alsheich-Bartok, O., Louriya-Hayon, I., Corneille, V., Kumar, B., Woods, S. J., Opat, S., *et al.* (2012). E6AP ubiquitin ligase regulates PML-induced senescence in Myc-driven lymphomagenesis. *Blood* 120, 822-832.

Xiao, Z. X., Chen, J., Levine, A. J., Modjtahedi, N., Xing, J., Sellers, W. R., and Livingston, D. M. (1995). Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 375, 694-698.

Yap, D. B., Hsieh, J. K., Chan, F. S., and Lu, X. (1999). mdm2: a bridge over the two tumour suppressors, p53 and Rb. *Oncogene* 18, 7681-7689.

30 Zezula, J., Casaccia-Bonnel, P., Ezhevsky, S. A., Osterhout, D. J., Levine, J. M., Dowdy, S. F., Chao, M. V., and Koff, A. (2001). p21cip1 is required for the differentiation of oligodendrocytes independently of cell cycle withdrawal. *EMBO reports* 2, 27-34.

35 Zou, X., Ray, D., Aziyu, A., Christov, K., Boiko, A. D., Gudkov, A. V., and Kiyokawa, H. (2002). Cdk4 disruption renders primary mouse cells resistant to oncogenic transformation, leading to Arf/p53-independent senescence. *Genes & development* 16, 2923-2934.

Lista de secuencias

<110> Centro de Cáncer Memorial Sloan-Kettering

<120> Compañero de diagnóstico para inhibidores de CDK4

<130> 072734.0158

40 <150> Documento US 61/812412

<151> 16-04-2013

<150> Documento US 61/893755

<151> 21-10-2013

<160> 10

45 <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 782 003 T3

<210> 1

<211> 497

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 1

Met Val Arg Ser Arg Gln Met Cys Asn Thr Asn Met Ser Val Pro Thr
1 5 10 15

Asp Gly Ala Val Thr Thr Ser Gln Ile Pro Ala Ser Glu Gln Glu Thr
20 25 30

Leu Val Arg Pro Lys Pro Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Ser Val Gly
35 40 45

Ala Gln Lys Asp Thr Tyr Thr Met Lys Glu Val Leu Phe Tyr Leu Gly
50 55 60

Gln Tyr Ile Met Thr Lys Arg Leu Tyr Asp Glu Lys Gln Gln His Ile
65 70 75 80

Val Tyr Cys Ser Asn Asp Leu Leu Gly Asp Leu Phe Gly Val Pro Ser
85 90 95

Phe Ser Val Lys Glu His Arg Lys Ile Tyr Thr Met Ile Tyr Arg Asn
100 105 110

Leu Val Val Val Asn Gln Gln Glu Ser Ser Asp Ser Gly Thr Ser Val
115 120 125

Ser Glu Asn Arg Cys His Leu Glu Gly Gly Ser Asp Gln Lys Asp Leu
130 135 140

Val Gln Glu Leu Gln Glu Glu Lys Pro Ser Ser Ser His Leu Val Ser
145 150 155 160

ES 2 782 003 T3

Arg Pro Ser Thr Ser Ser Arg Arg Arg Ala Ile Ser Glu Thr Glu Glu
165 170 175

Asn Ser Asp Glu Leu Ser Gly Glu Arg Gln Arg Lys Arg His Lys Ser
180 185 190

Asp Ser Ile Ser Leu Ser Phe Asp Glu Ser Leu Ala Leu Cys Val Ile
195 200 205

Arg Glu Ile Cys Cys Glu Arg Ser Ser Ser Ser Glu Ser Thr Gly Thr
210 215 220

Pro Ser Asn Pro Asp Leu Asp Ala Gly Val Ser Glu His Ser Gly Asp
225 230 235 240

Trp Leu Asp Gln Asp Ser Val Ser Asp Gln Phe Ser Val Glu Phe Glu
245 250 255

Val Glu Ser Leu Asp Ser Glu Asp Tyr Ser Leu Ser Glu Glu Gly Gln
260 265 270

Glu Leu Ser Asp Glu Asp Asp Glu Val Tyr Gln Val Thr Val Tyr Gln
275 280 285

Ala Gly Glu Ser Asp Thr Asp Ser Phe Glu Glu Asp Pro Glu Ile Ser
290 295 300

Leu Ala Asp Tyr Trp Lys Cys Thr Ser Cys Asn Glu Met Asn Pro Pro
305 310 315 320

Leu Pro Ser His Cys Asn Arg Cys Trp Ala Leu Arg Glu Asn Trp Leu
325 330 335

Pro Glu Asp Lys Gly Lys Asp Lys Gly Glu Ile Ser Glu Lys Ala Lys
340 345 350

Leu Glu Asn Ser Thr Gln Ala Glu Glu Gly Phe Asp Val Pro Asp Cys
355 360 365

Lys Lys Thr Ile Val Asn Asp Ser Arg Glu Ser Cys Val Glu Glu Asn
370 375 380

Asp Asp Lys Ile Thr Gln Ala Ser Gln Ser Gln Glu Ser Glu Asp Tyr
385 390 395 400

Ser Gln Pro Ser Thr Ser Ser Ser Ile Ile Tyr Ser Ser Gln Glu Asp

ES 2 782 003 T3

Lys Glu Pro Cys Ala Glu Glu Asp Ser Glu Glu Lys Ala Glu Gln Thr
 370 375 380

Pro Leu Ser Gln Glu Ser Asp Asp Tyr Ser Gln Pro Ser Thr Ser Ser
 385 390 395 400

Ser Ile Val Tyr Ser Ser Gln Glu Ser Val Lys Glu Leu Lys Glu Glu
 405 410 415

Thr Gln Asp Lys Asp Glu Ser Val Glu Ser Ser Phe Ser Leu Asn Ala
 420 425 430

Ile Glu Pro Cys Val Ile Cys Gln Gly Arg Pro Lys Asn Gly Cys Ile
 435 440 445

Val His Gly Lys Thr Gly His Leu Met Ser Cys Phe Thr Cys Ala Lys
 450 455 460

Lys Leu Lys Lys Arg Asn Lys Pro Cys Pro Val Cys Arg Gln Pro Ile
 465 470 475 480

Gln Met Ile Val Leu Thr Tyr Phe Asn
 485

<210> 3

<211> 458

<212> PRT

5 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 3

Met Cys Asn Thr Asn Met Ser Val Ser Thr Glu Gly Ala Ala Gly Thr
 1 5 10 15

Ser Gln Ile Pro Ala Ser Glu Gln Glu Thr Leu Ile Ile Phe Tyr Ile
 20 25 30

Gly Gln Tyr Ile Met Thr Lys Arg Leu Tyr Asp Glu Lys Gln Gln His
 35 40 45

Ile Val Tyr Cys Ser Asn Asp Leu Leu Gly Asp Val Phe Gly Val Pro
 50 55 60

Ser Phe Ser Val Lys Glu His Arg Lys Ile Tyr Ala Met Ile Tyr Arg
 65 70 75 80

Asn Leu Val Val Val Ser Gln Gln Asp Ser Gly Thr Ser Pro Ser Glu
 85 90 95

ES 2 782 003 T3

Ser Arg Cys Gln Pro Glu Gly Gly Ser Asp Leu Lys Asp Pro Val Gln
100 105 110

Ala Ser Gln Glu Glu Lys Pro Ser Ser Ser Asp Val Val Ser Arg Pro
115 120 125

Ser Thr Ser Ser Arg Arg Arg Ala Ile Ser Glu Thr Glu Glu Asn Thr
130 135 140

Asp Glu Leu Pro Gly Glu Arg Gln Arg Lys Arg His Arg Ala Leu Ser
145 150 155 160

Phe Asp Glu Ser Leu Gly Leu Cys Val Leu Arg Glu Ile Cys Cys Glu
165 170 175

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

Asp Asp Gly Val Ser Asp His Ser Ala Asp Cys Leu Asp Gln Asp Ser
195 200 205

Val Ser Asp Gln Phe Ser Val Glu Phe Glu Val Glu Ser Leu Asp Ser
210 215 220

Glu Asp Tyr Ser Leu Ser Asp Glu Gly His Glu Leu Ser Asp Glu Asp
225 230 235 240

Asp Glu Val Tyr Arg Val Thr Val Tyr Gln Ala Gly Glu Ser Asp Ala
245 250 255

Asp Ser Phe Glu Gly Asp Pro Glu Ile Ser Leu Ala Asp Tyr Trp Lys
260 265 270

Cys Thr Ser Cys Asn Glu Met Asn Pro Pro Leu Pro Ser His Cys Asn
275 280 285

Arg Cys Trp Thr Leu Arg Glu Asn Trp Leu Pro Asp Asp Lys Gly Lys
290 295 300

Asp Lys Val Glu Ile Ser Glu Lys Ala Lys Leu Glu Ser Ser Asp Gln
305 310 315 320

Ala Glu Glu Gly Leu Asp Val Pro Asp Gly Lys Lys Val Thr Glu Asp
325 330 335

Asp Ala Lys Glu Ser Ser Ala Glu Asp Ser Glu Glu Lys Val Ala Gln
340 345 350

ES 2 782 003 T3

Met Leu Leu Ser Gln Glu Ser Asp Asp Tyr Ser Gln Pro Ser Thr Ser
 355 360 365

Ser Ser Ile Val Tyr Ser Ser Gln Glu Ser Gly Lys Glu Leu Lys Glu
 370 375 380

Asp Thr Gln Asp Lys Glu Glu Ser Met Glu Ser Ser Phe Ser Leu Asn
 385 390 395 400

Ala Ile Glu Pro Cys Val Ile Cys Gln Gly Arg Pro Lys Asn Gly Cys
 405 410 415

Ile Val His Gly Lys Thr Gly His Leu Met Ser Cys Phe Thr Cys Ala
 420 425 430

Lys Lys Leu Lys Lys Arg Asn Lys Pro Cys Pro Val Cys Arg Gln Pro
 435 440 445

Ile Gln Met Ile Val Leu Thr Tyr Phe Asn
 450 455

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNhp de CDK4

<400> 4

gagattactt tgctgcctta a

21

10 <210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> ARNhp de MDM2 (M376)

<400> 5

ttcactattc cactaccaa g

21

<210> 6

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNhp de MDM2 (M380)

<400> 6

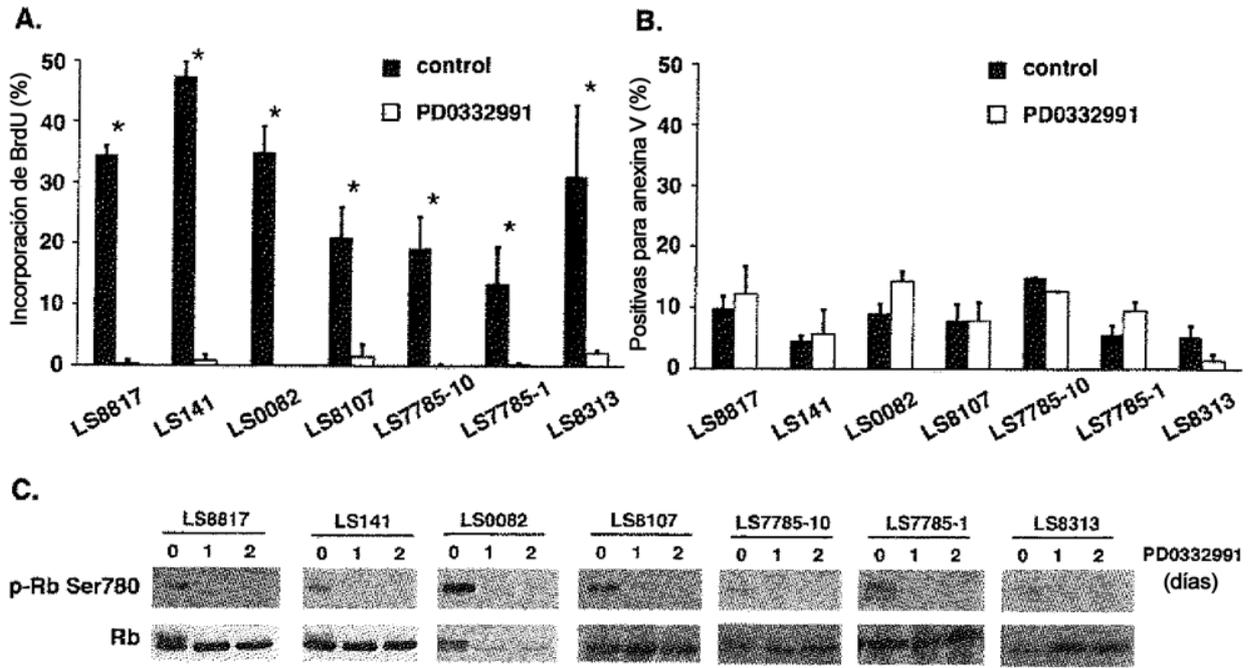
	tactagaagt tgatggctga g	21
	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNhp de HAUSP (4057)	
	<400> 7	
	ccagctaagt atcaaaggaa a	21
10	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> ARNhp de HAUSP (845)	
	<400> 8	
	cgtggtgtca aggtgtacta a	21
	<210> 9	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNhp de CDK6	
	<400> 9	
25	gacctggaaa ggtgcaaaga a	21
	<210> 10	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> ARNhp de MDM2 (apareamiento erróneo)	
	<400> 10	
	actattctca accctcaact tcta	24

35

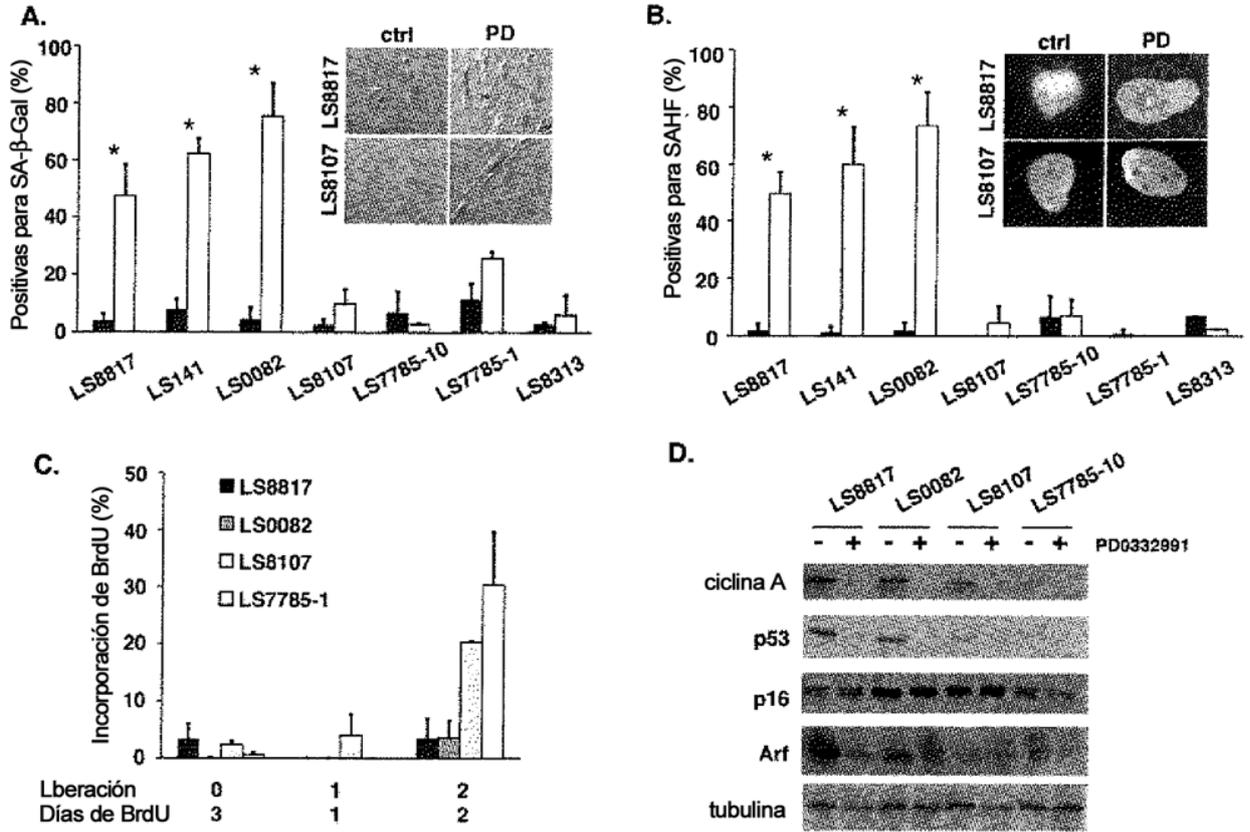
REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para determinar si es probable que un inhibidor de CDK4 produzca un efecto anticancerígeno en un cáncer, que comprende determinar si las células del cáncer tienen una expresión reducida de MDM2 tras el tratamiento con el inhibidor de CDK4, en el que si la expresión de MDM2 se reduce, es más probable que el inhibidor de CDK4 tenga un efecto anticancerígeno sobre el cáncer,
 5 en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en liposarcoma, glioma y cáncer de mama, y el inhibidor de CDK4 seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de CDK4 competitivo con ATP, un inhibidor de CDK4 derivado de compuestos de piridopirimidina, pirrolopirimidina o indolocarbazol, isetionato de palbociclib, LEE011, LY2835219, PD0332991, clorhidrato de flavopiridol, un oligonucleótido antisentido,
 10 una molécula de ARNhp o una molécula de ARNip que inhibe la expresión o actividad de CDK4.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la expresión de MDM2 se determina mediante inmunofluorescencia o inmunotransferencia de tipo Western.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el cáncer es cáncer de mama.
4. Uso de un reactivo para detectar la expresión de MDM2 en el método según la reivindicación 1.
- 15 5. Uso según la reivindicación 4, en el que el reactivo para detectar la expresión de MDM2 comprende una o más sondas empaquetadas, alineamientos/microalineamientos, perlas y/o anticuerpos específicos de biomarcadores.
6. Uso según la reivindicación 4, en el que el reactivo para detectar la expresión de MDM2 comprende uno o más anticuerpos para detectar la proteína MDM2.
- 20 7. Uso según la reivindicación 4, en el que el cáncer es cáncer de mama.
8. Inhibidor de CDK4 seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de CDK4 competitivo con ATP, un inhibidor de CDK4 derivado de compuestos de piridopirimidina, pirrolopirimidina o indolocarbazol, isetionato de palbociclib, LEE011, LY2835219, PD0332991, clorhidrato de flavopiridol, un oligonucleótido antisentido,
 25 una molécula de ARNhp o una molécula de ARNip que inhibe la expresión o actividad de CDK4 para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer seleccionado del grupo que consiste en liposarcoma, glioma y cáncer de mama, en el que las células cancerosas del sujeto se someten a ensayo antes del tratamiento del sujeto con un inhibidor de CDK4 y se determina que presentan una disminución en la expresión de MDM2 tras el tratamiento *in vitro* con el inhibidor de CDK4.
9. Inhibidor de CDK4 según la reivindicación 8 para el uso según la reivindicación 8, en el que la expresión de MDM2 se determina mediante inmunofluorescencia.
- 30 10. Inhibidor de CDK4 según la reivindicación 8 para el uso según la reivindicación 8, en el que la expresión de MDM2 se determina mediante inmunotransferencia de tipo Western.
11. Inhibidor de CDK4 según la reivindicación 8 para el uso según la reivindicación 8, en el que el cáncer es
 35 cáncer de mama.

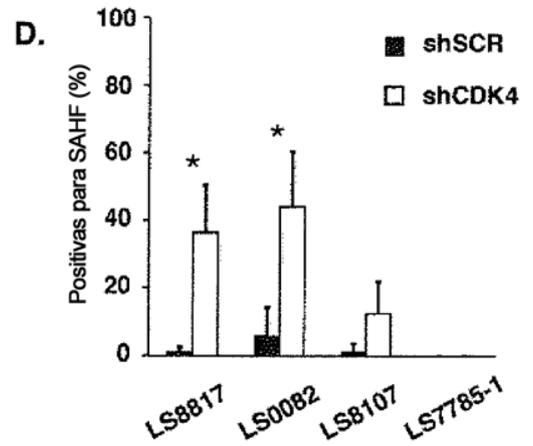
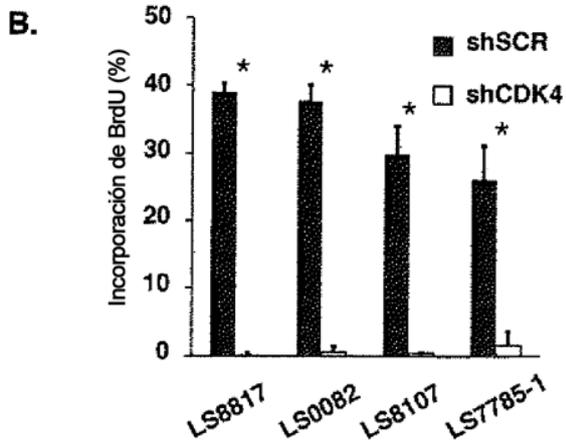
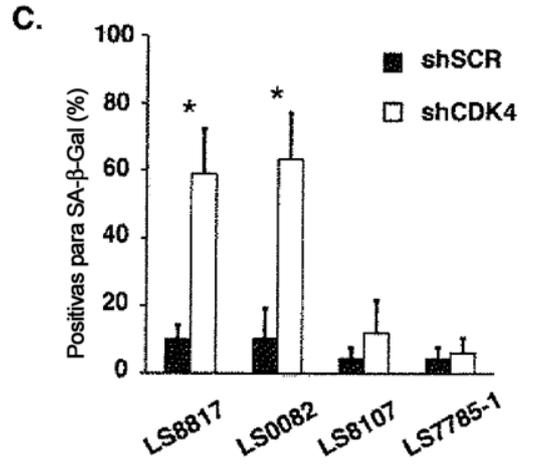
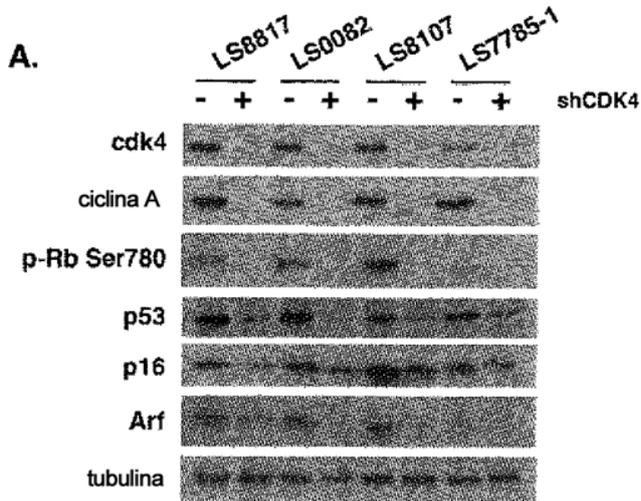
FIGURAS 1A-C



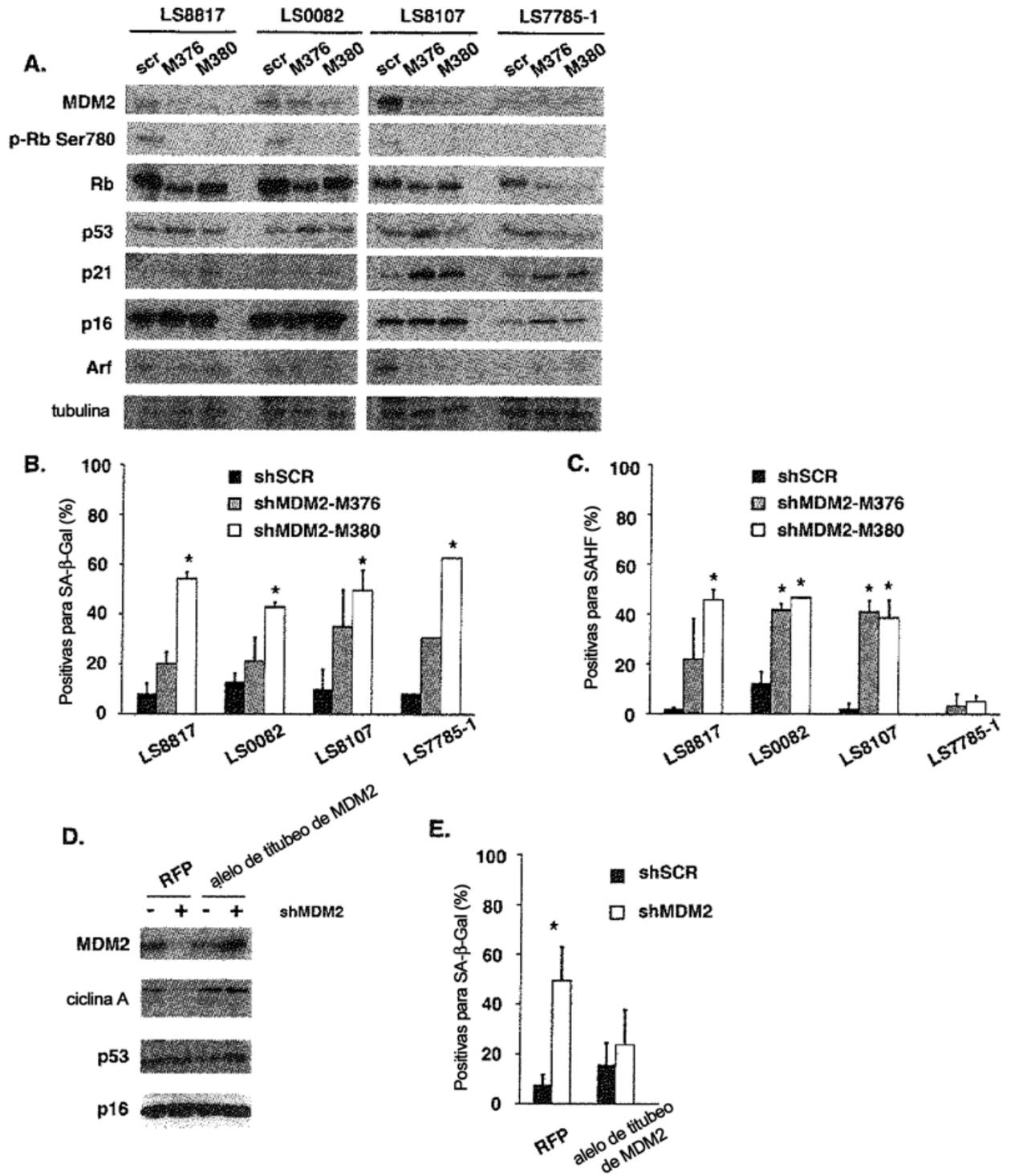
FIGURAS 2A-D



FIGURAS 3A-D



FIGURAS 4A-E



FIGURAS 5A-D

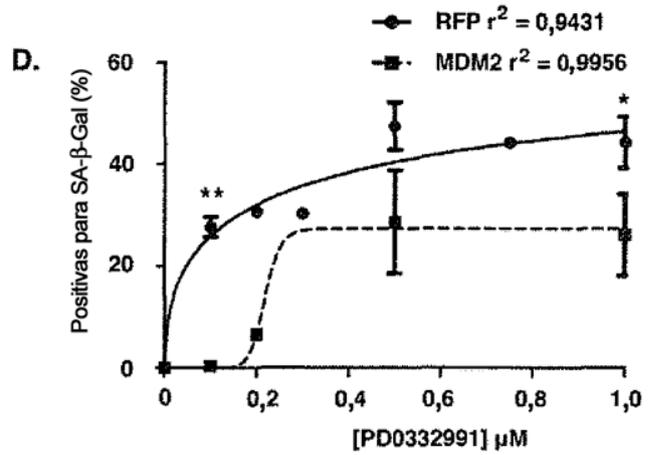
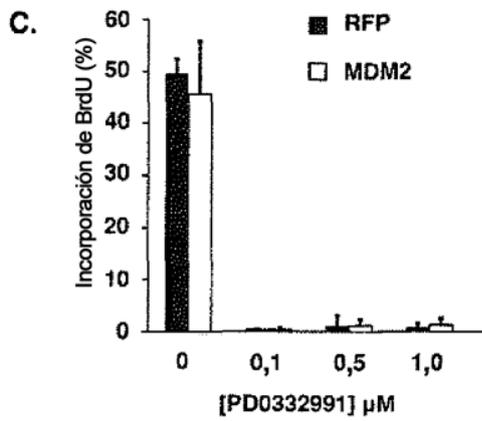
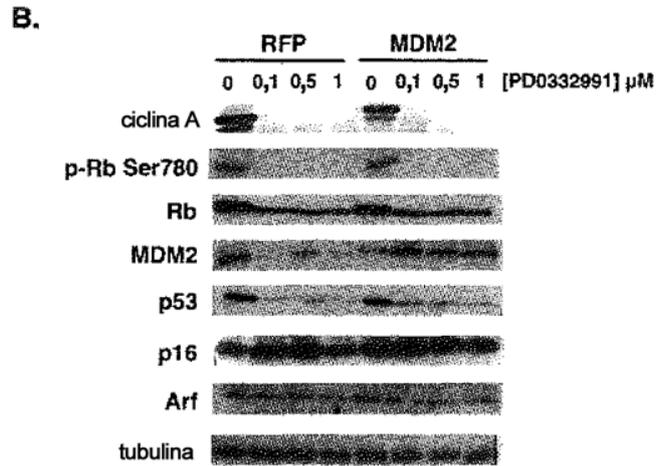
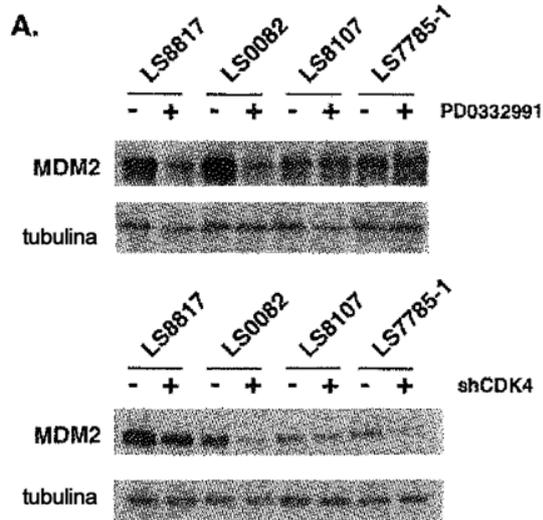


FIGURA 6A

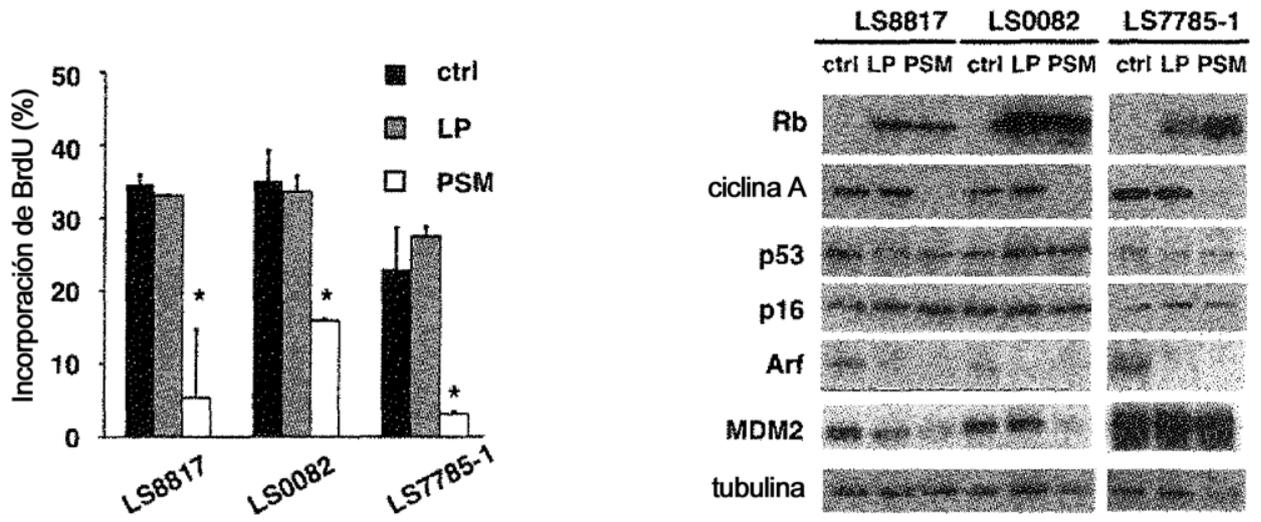


FIGURA 6B

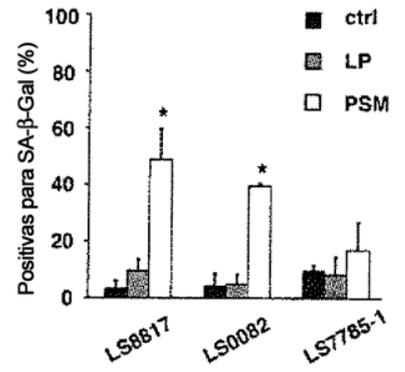
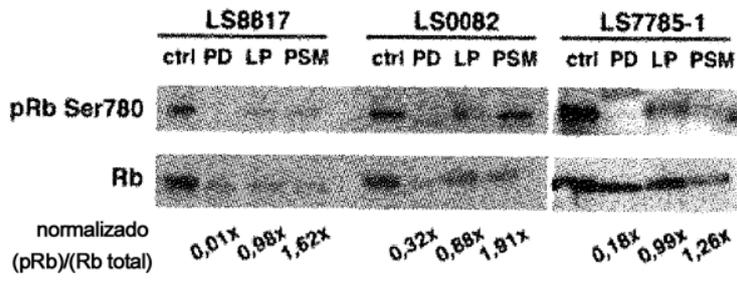


FIGURA 7

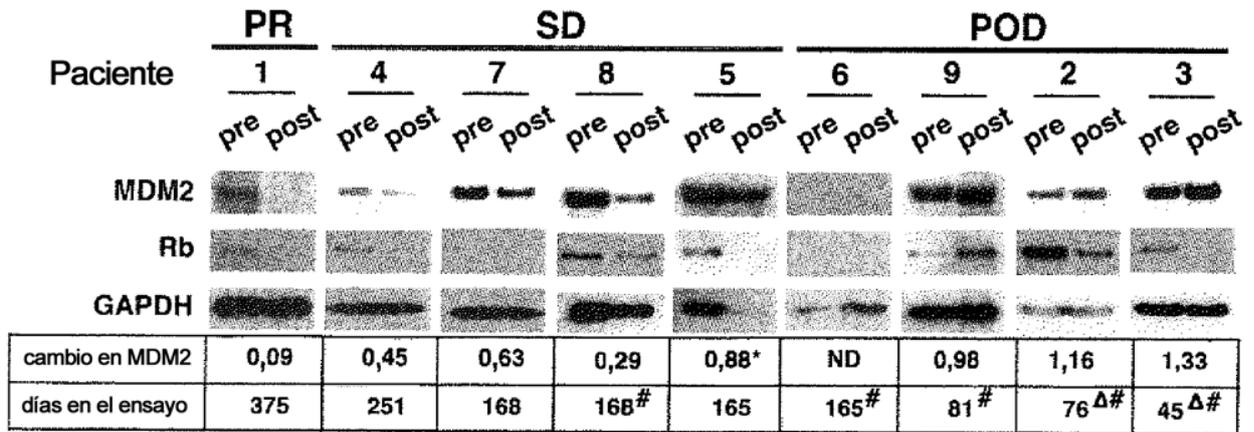
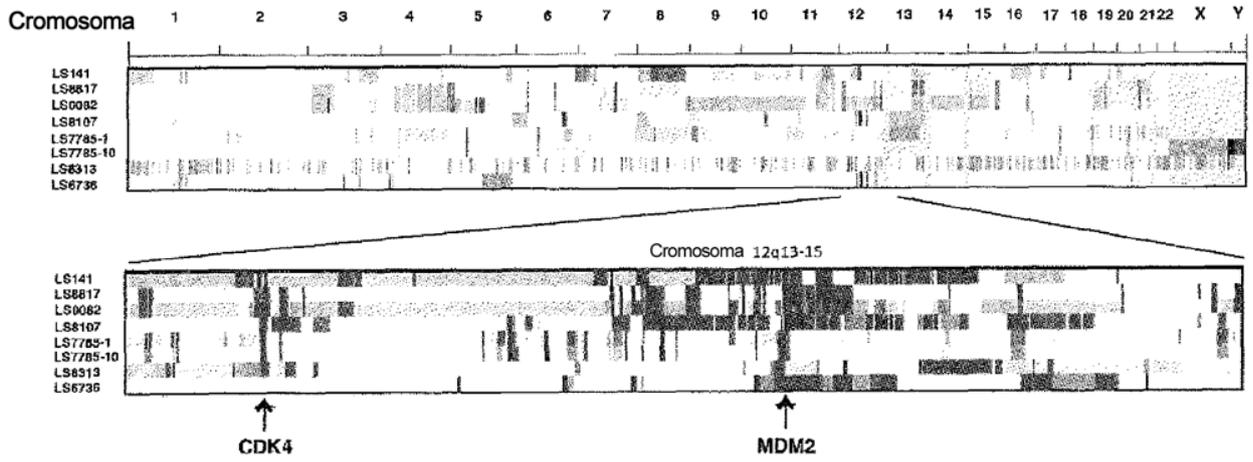
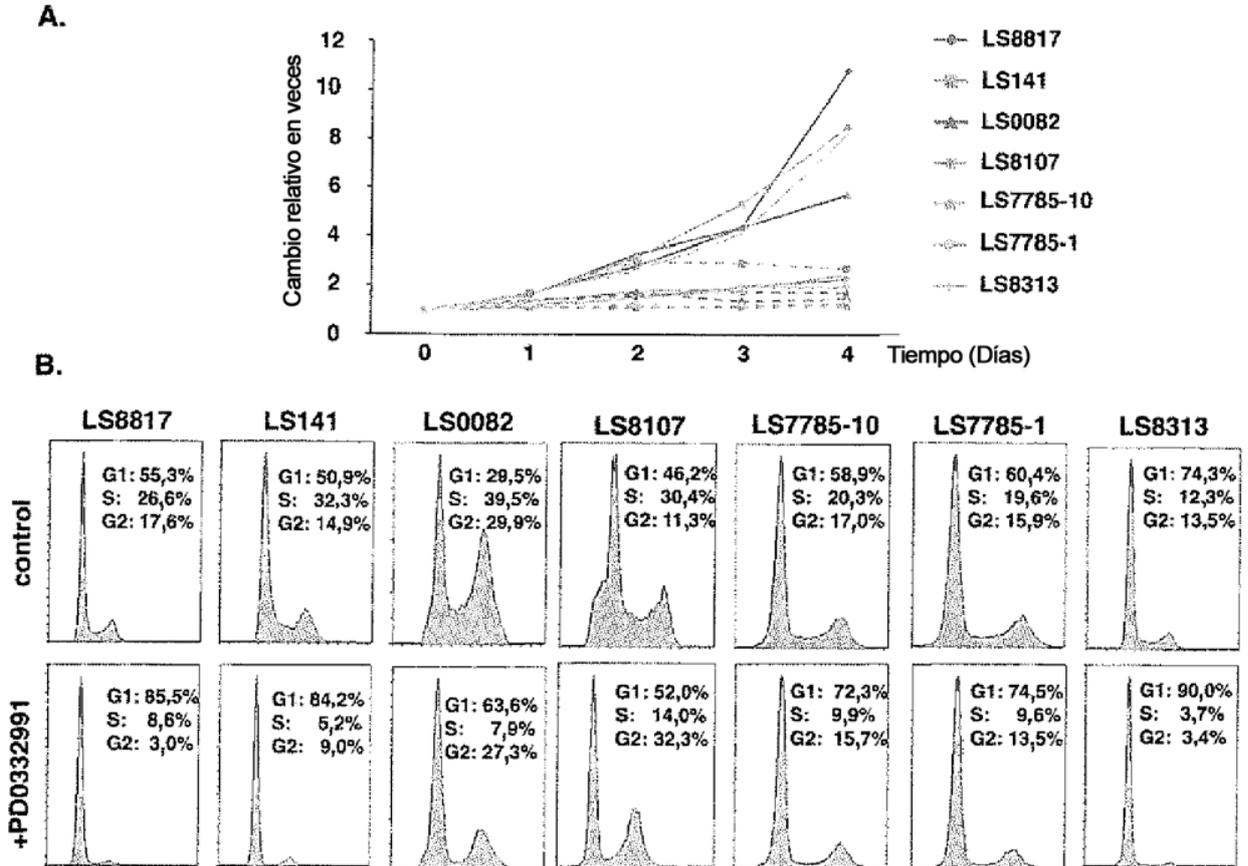


FIGURA 8



FIGURAS 9A-B



FIGURAS 10A-C

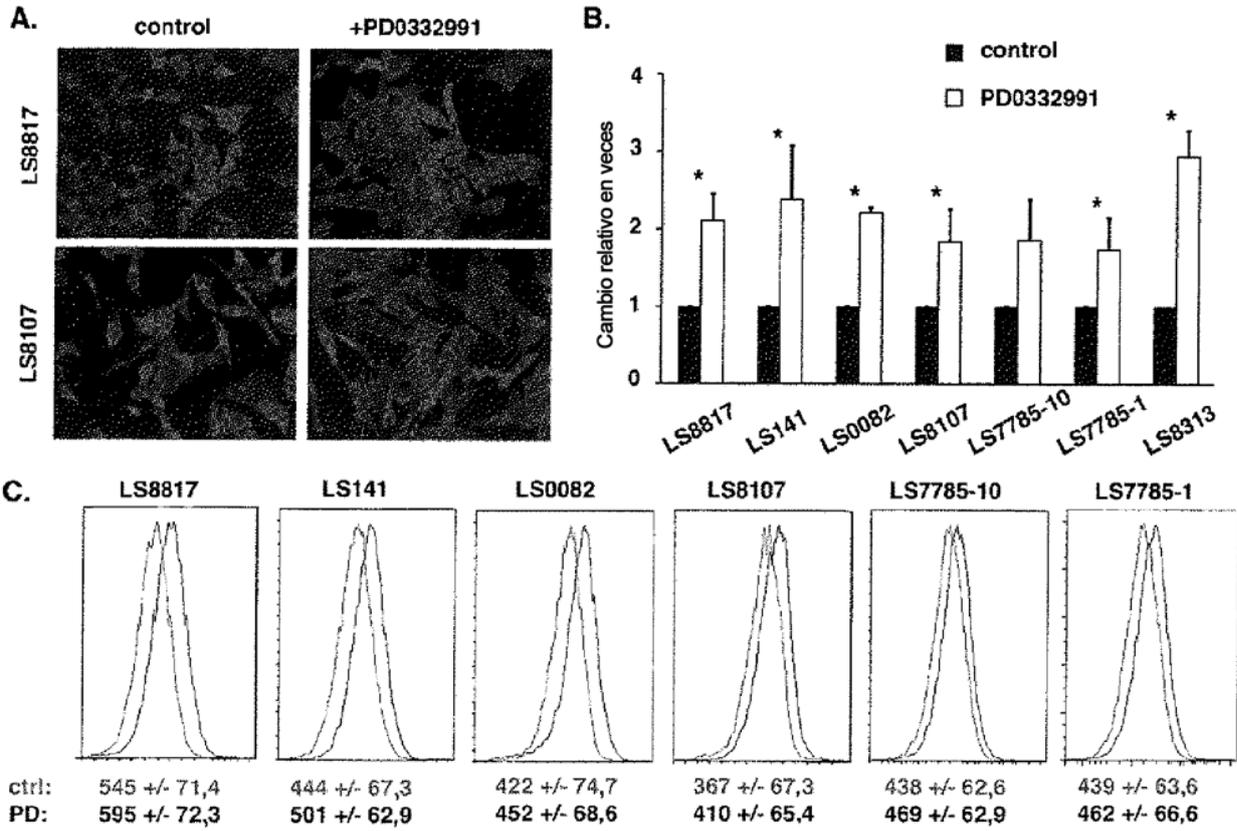
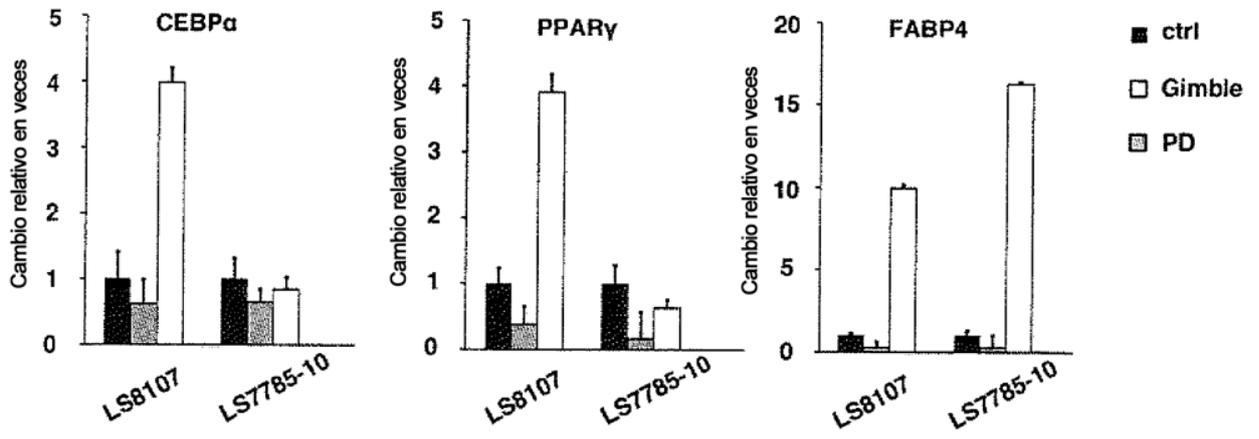
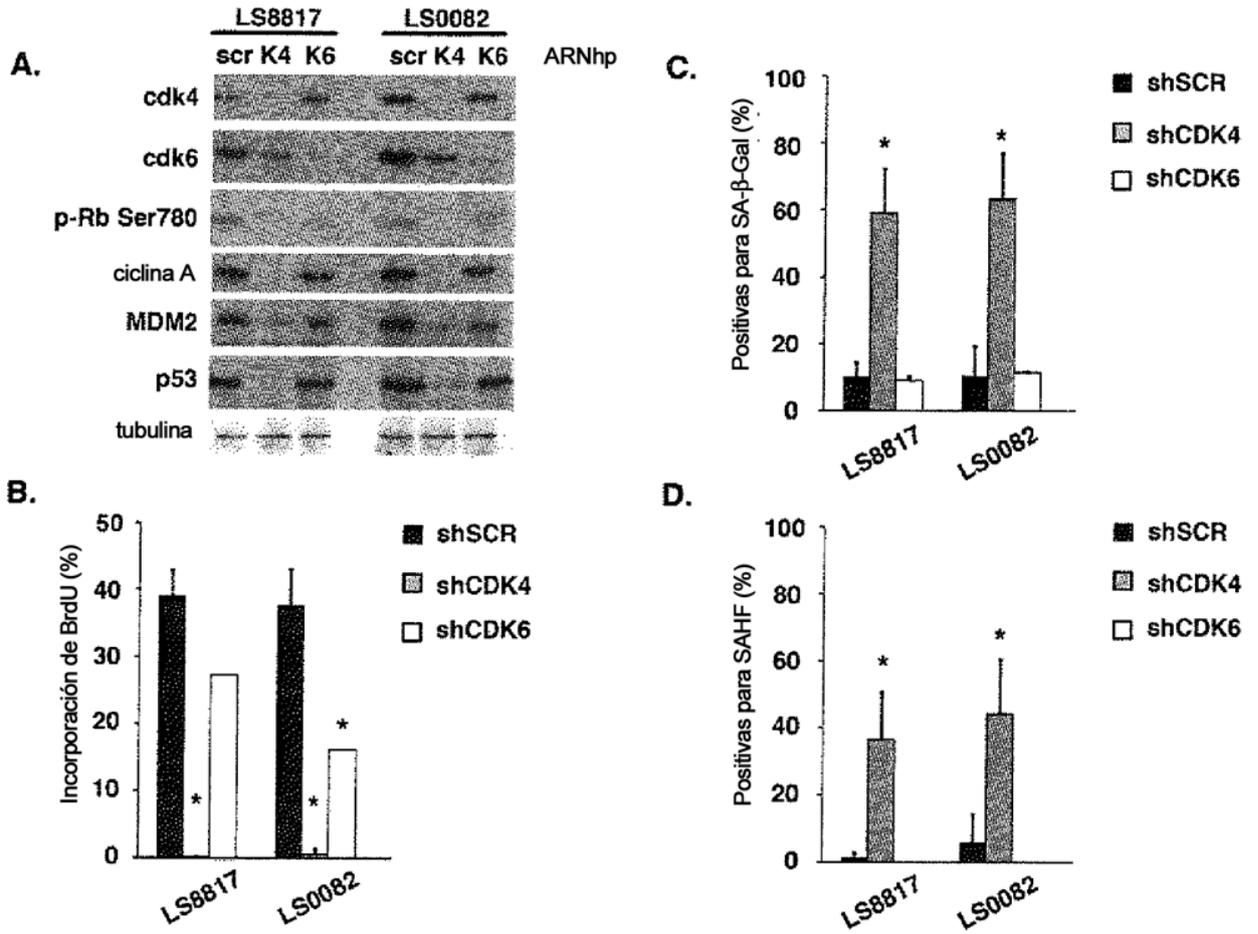


FIGURA 11

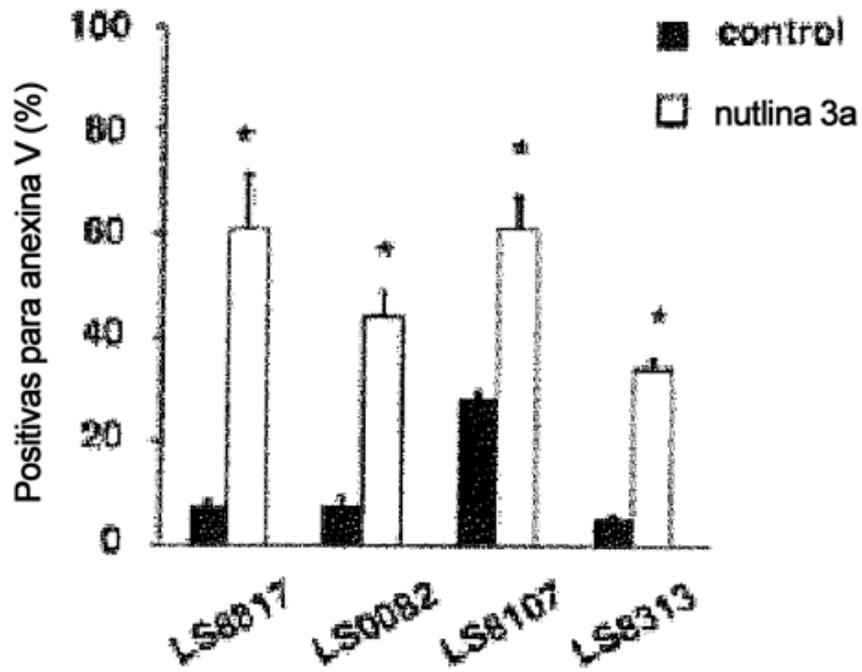


FIGURAS 12A-D

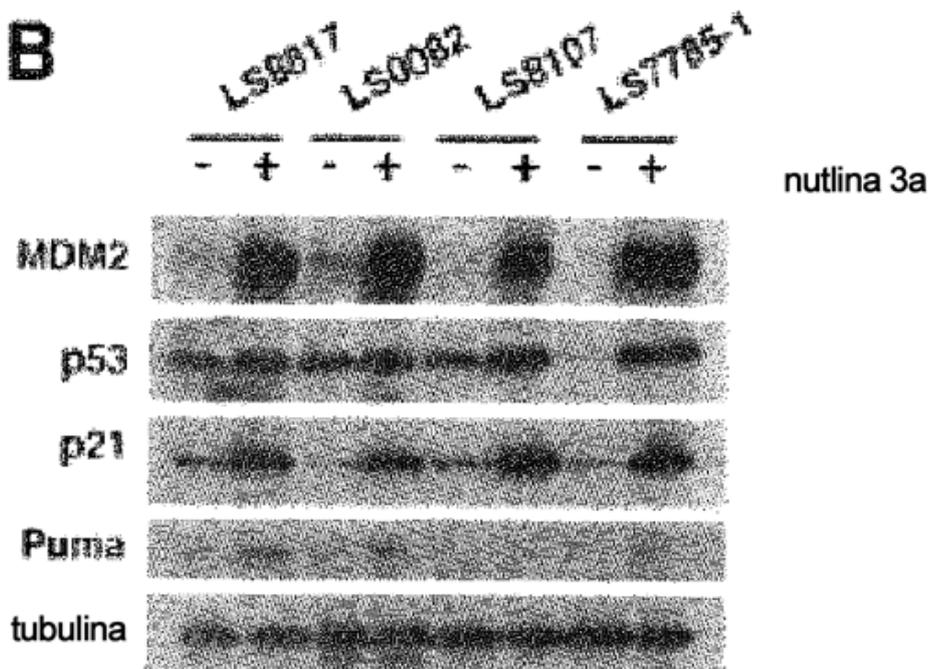


FIGURAS 13A-B

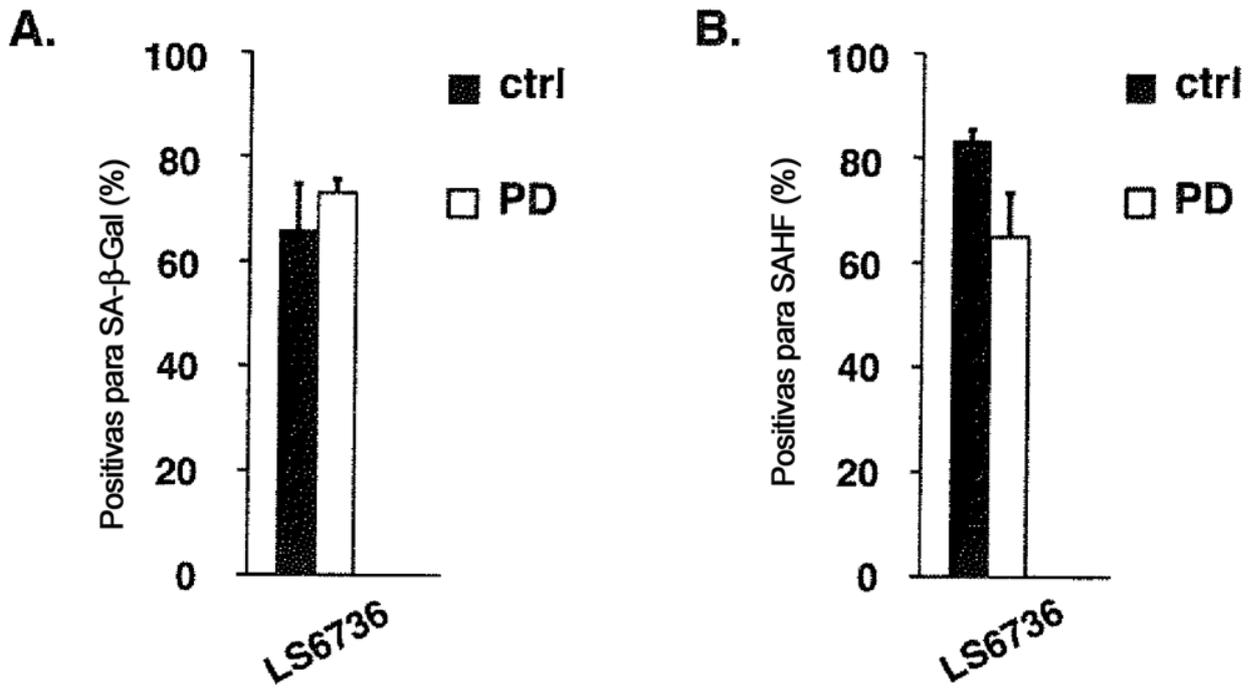
A



B



FIGURAS 14A-B



FIGURAS 15A-D

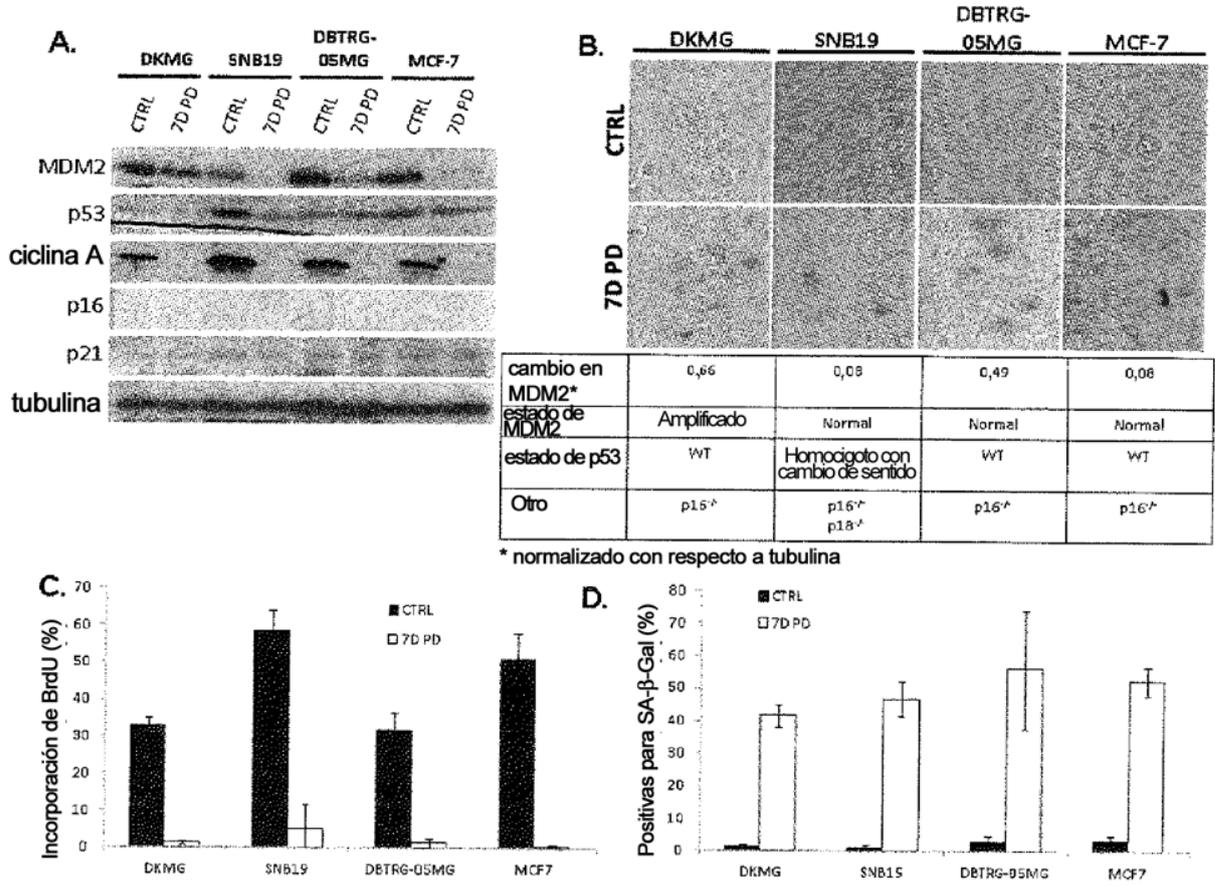


FIGURA 16

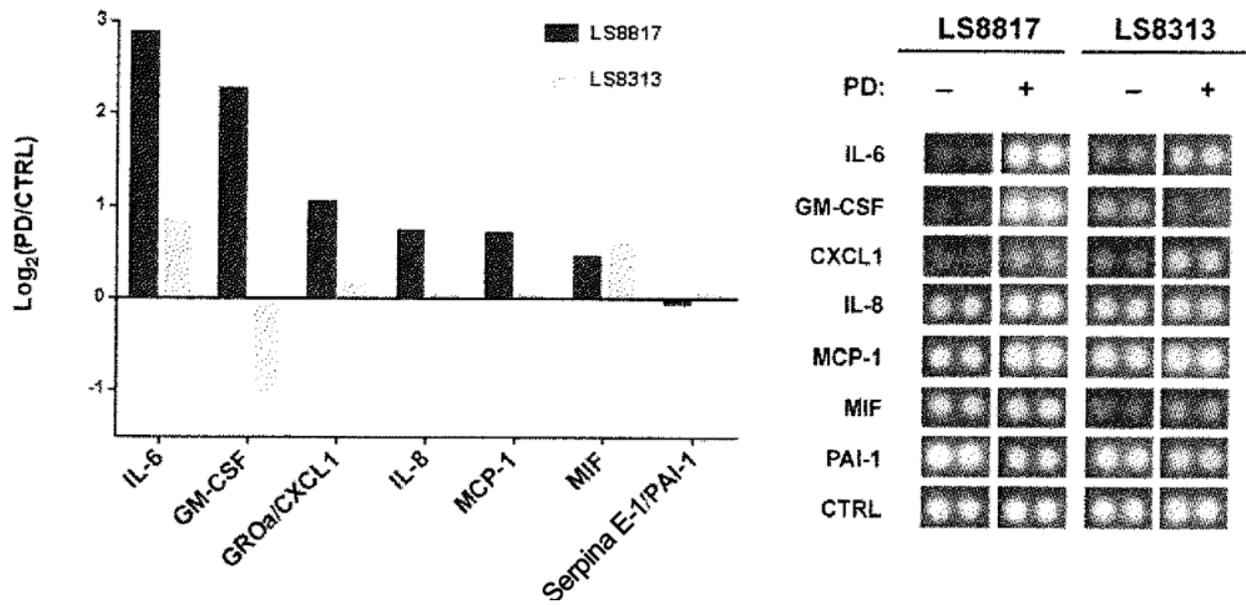
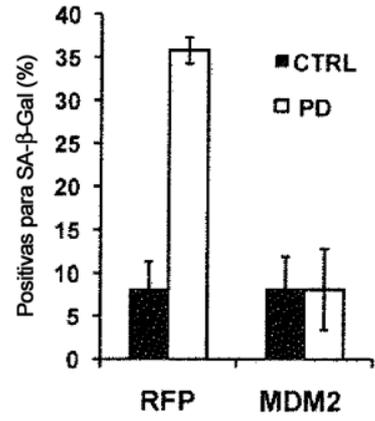
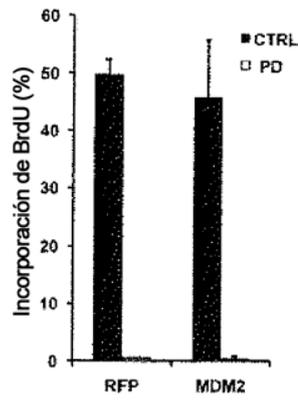
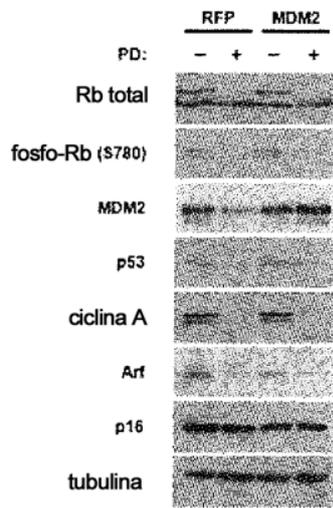
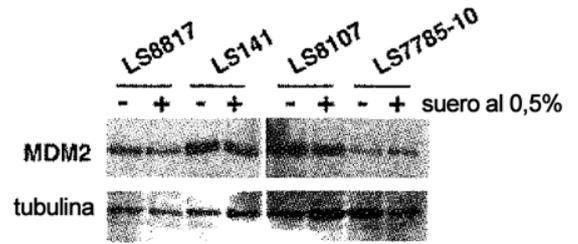
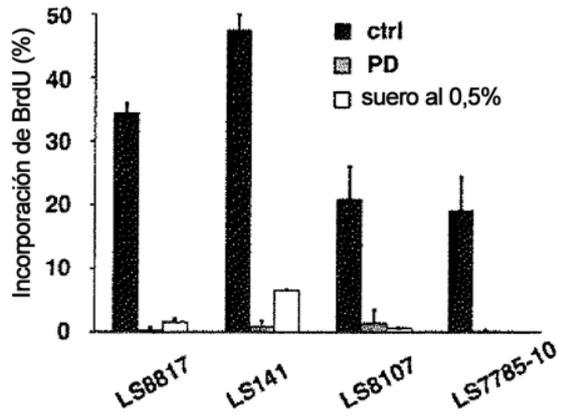


FIGURA 17



FIGURAS 18A-B

A



B

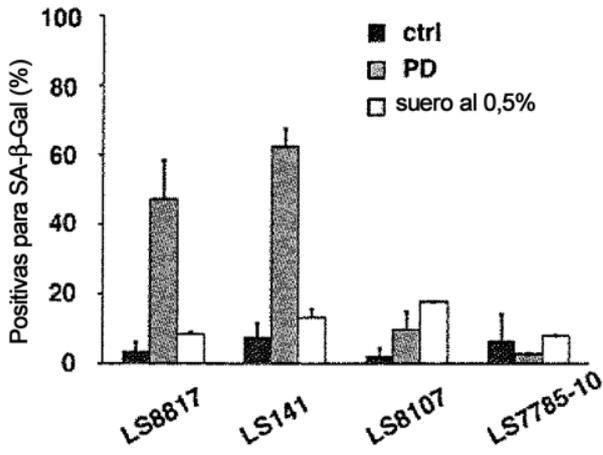


FIGURA 18C

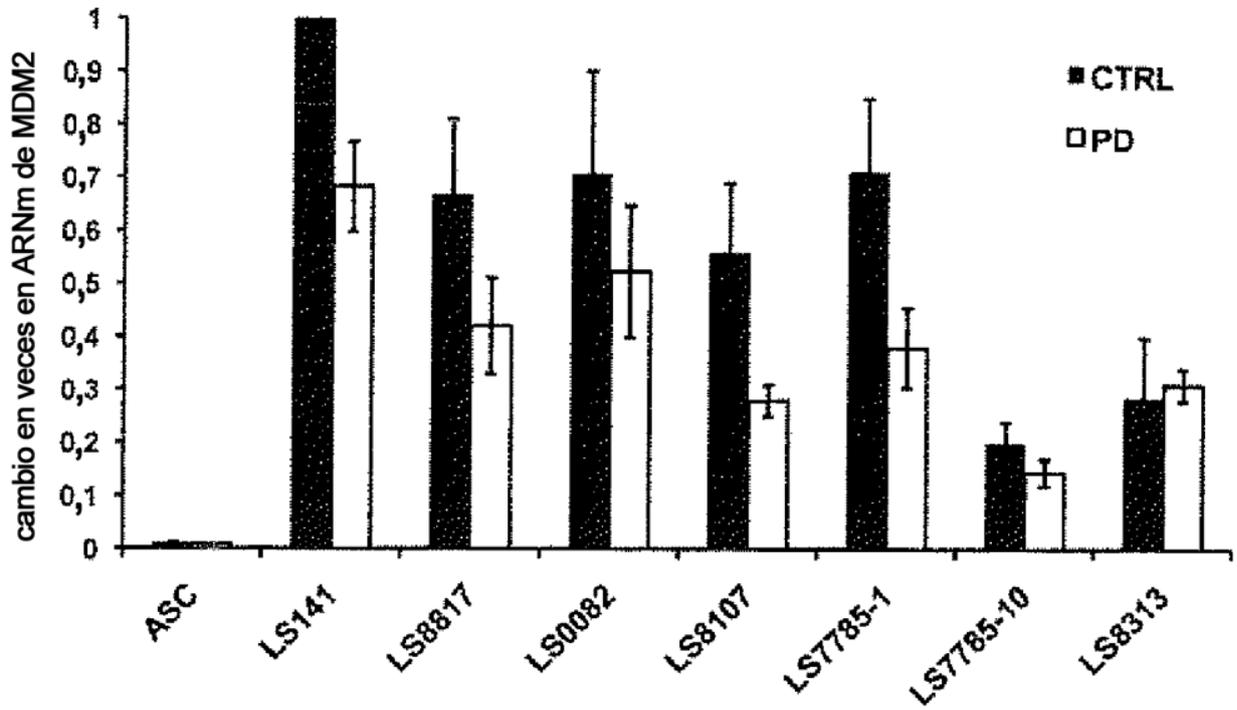


FIGURA 18D

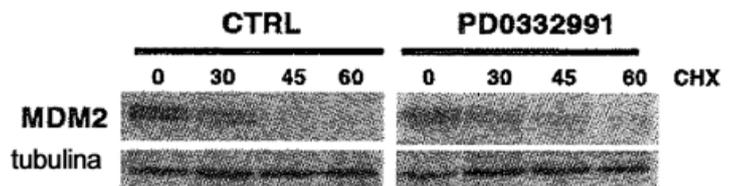
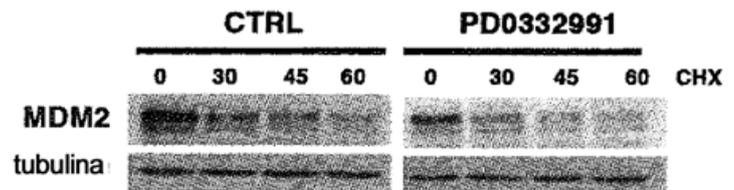
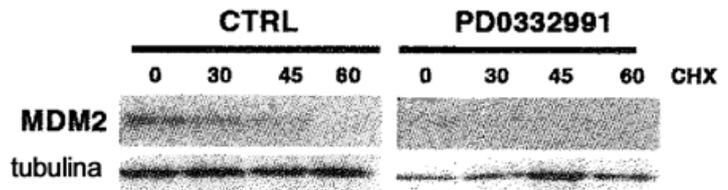
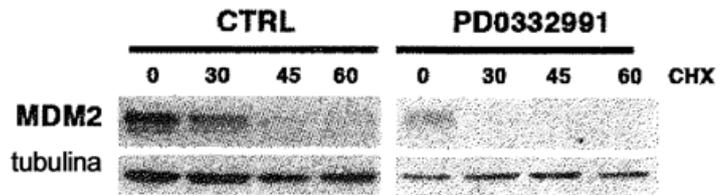
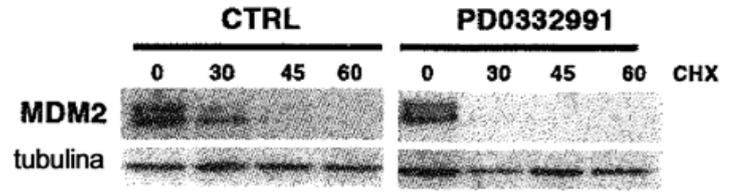
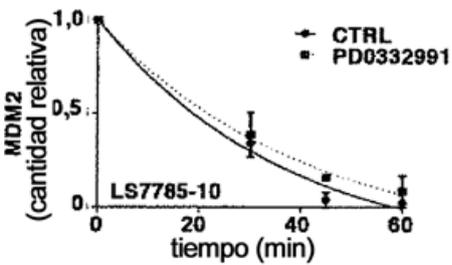
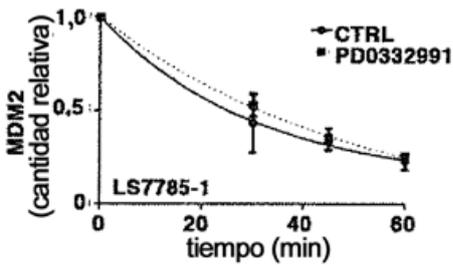
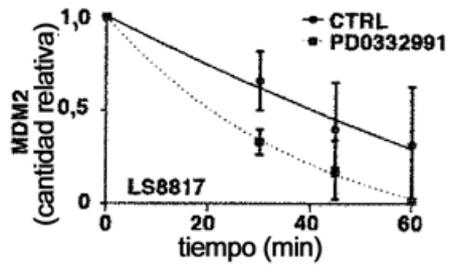
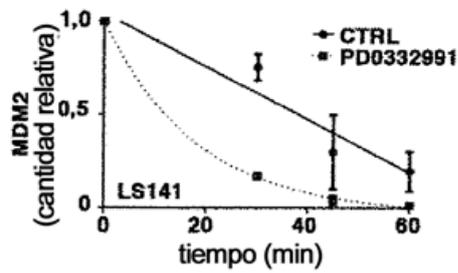
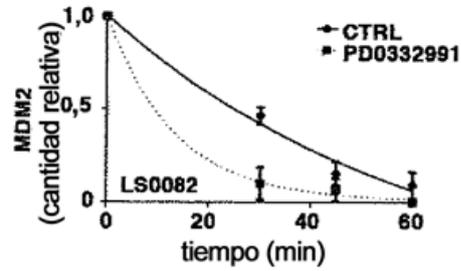
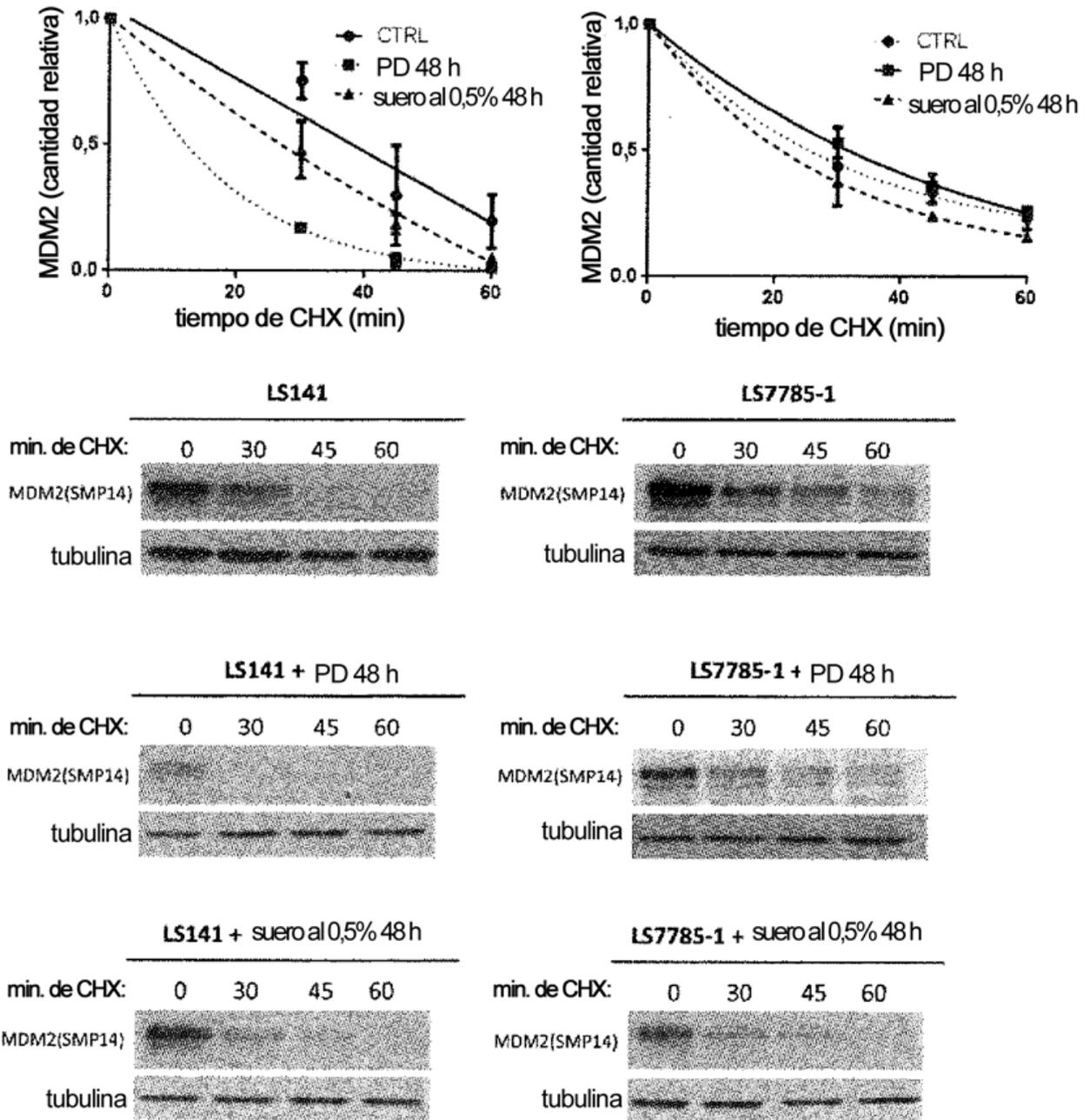


FIGURA 18E



FIGURAS 19A-C

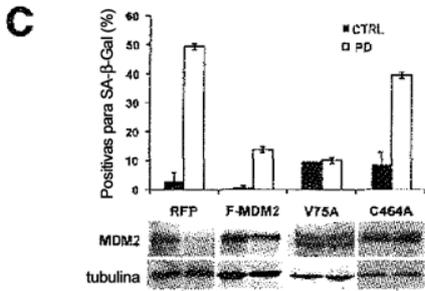
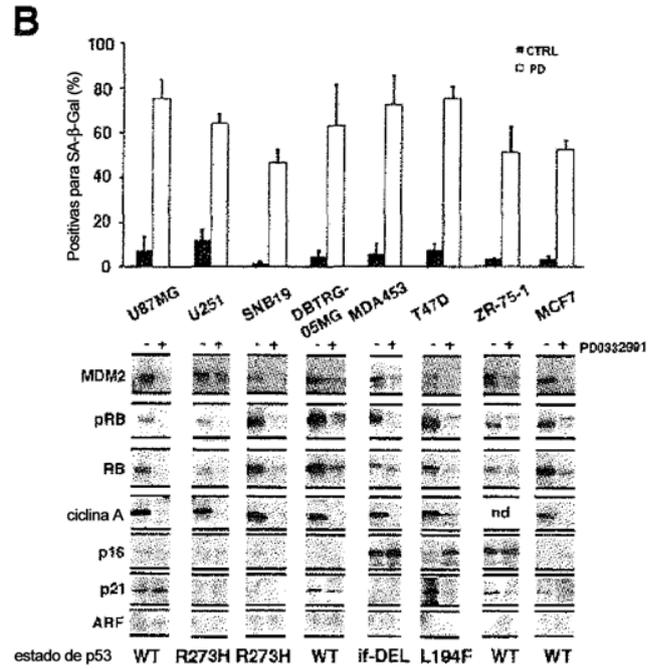
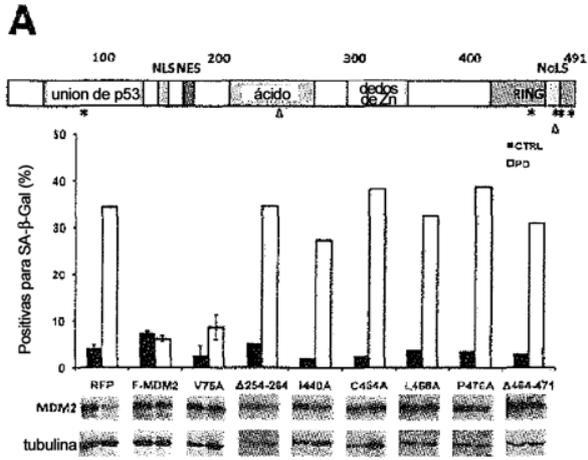


FIGURA 20

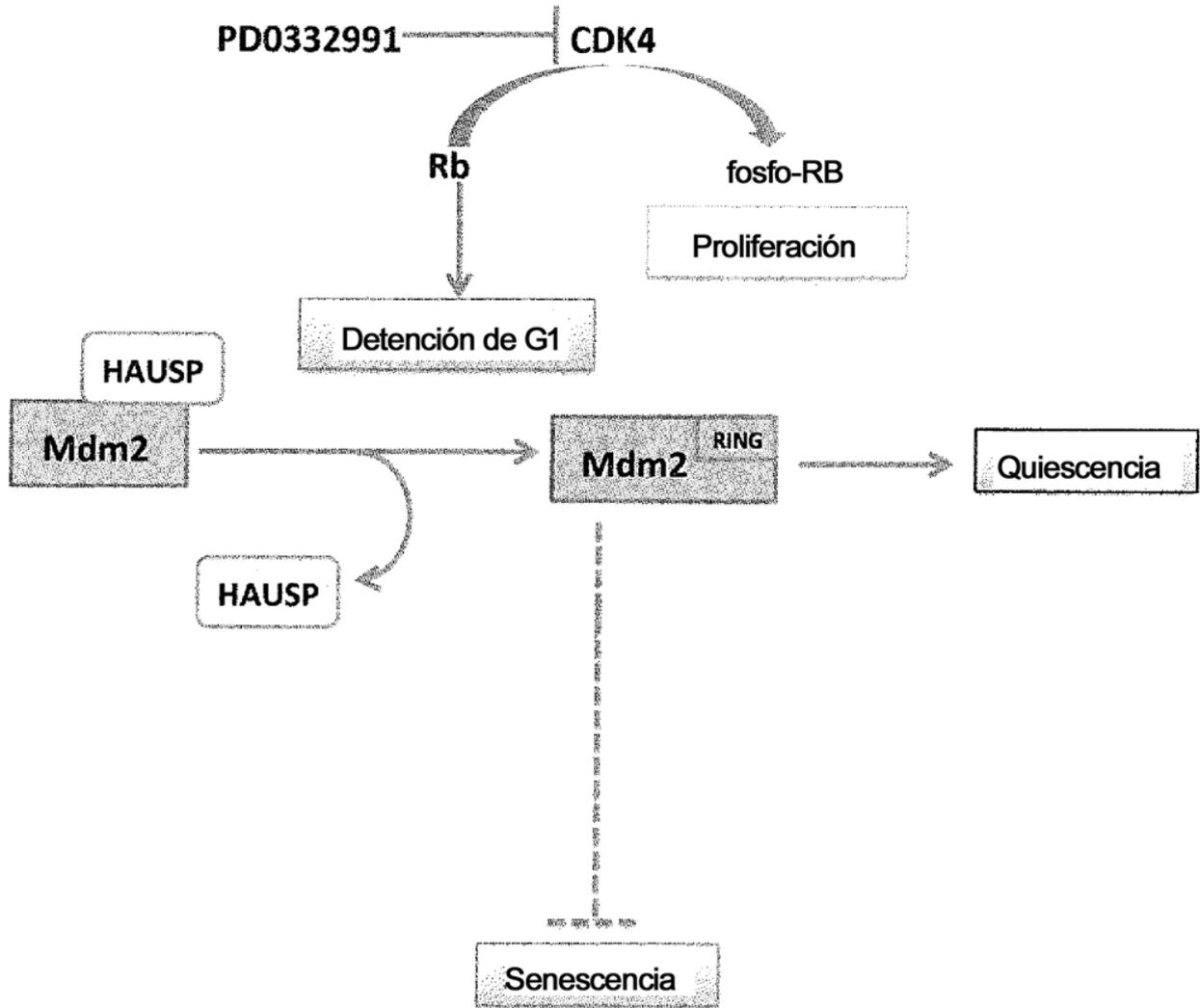


FIGURA 21A

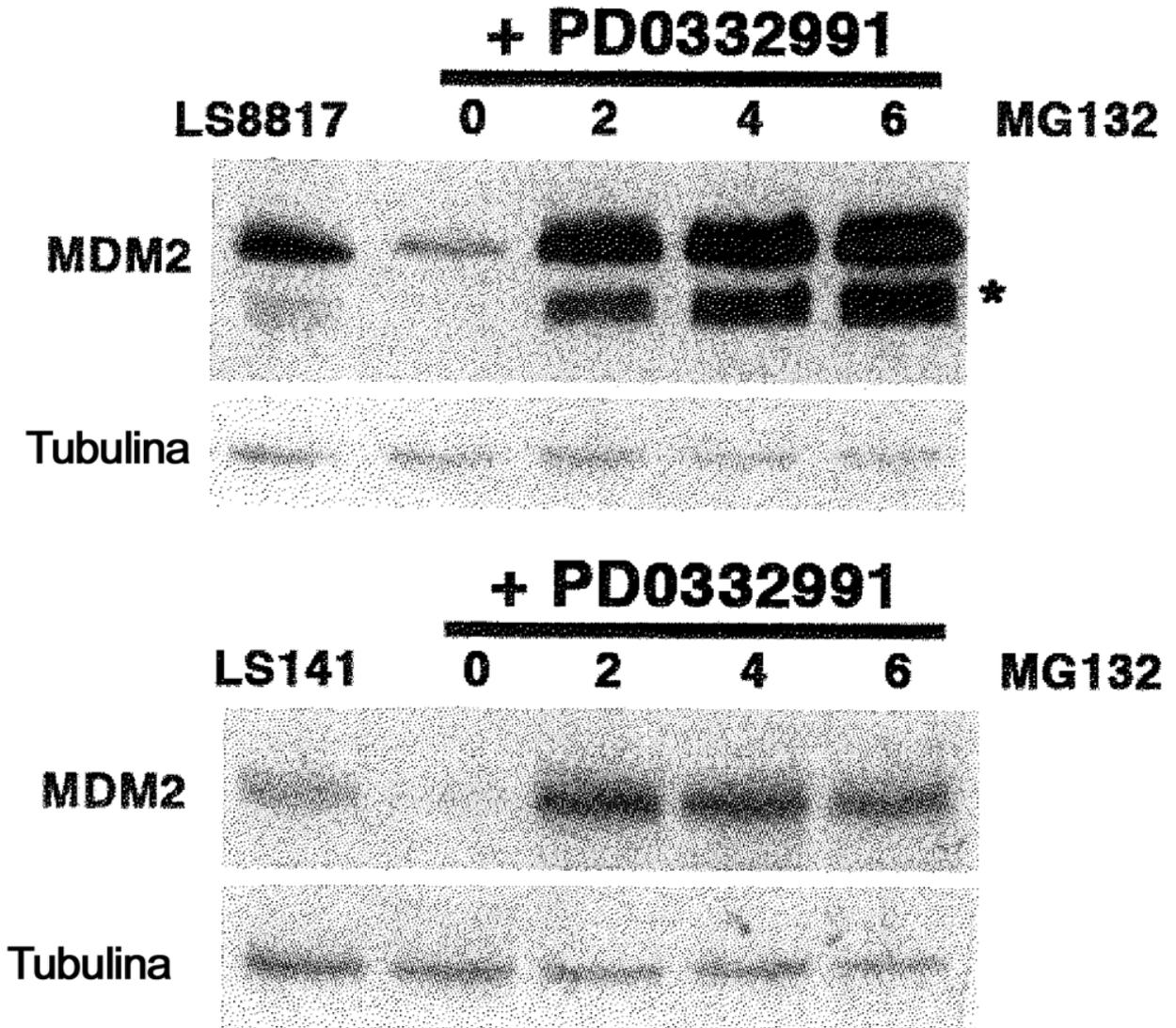


FIGURA 21B

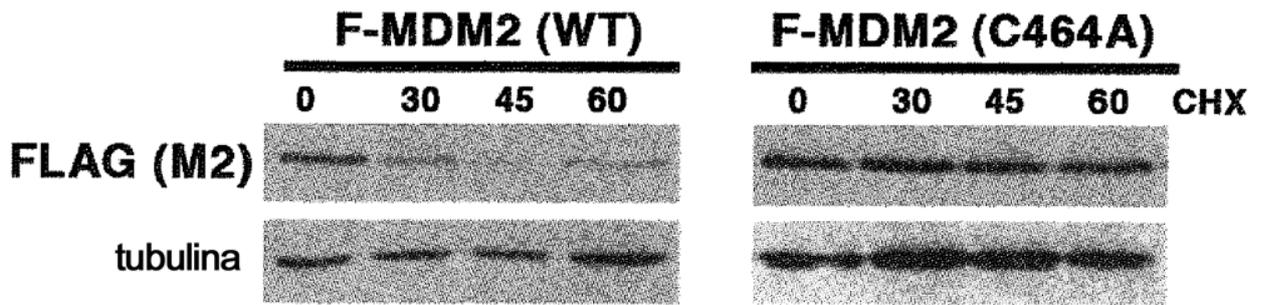
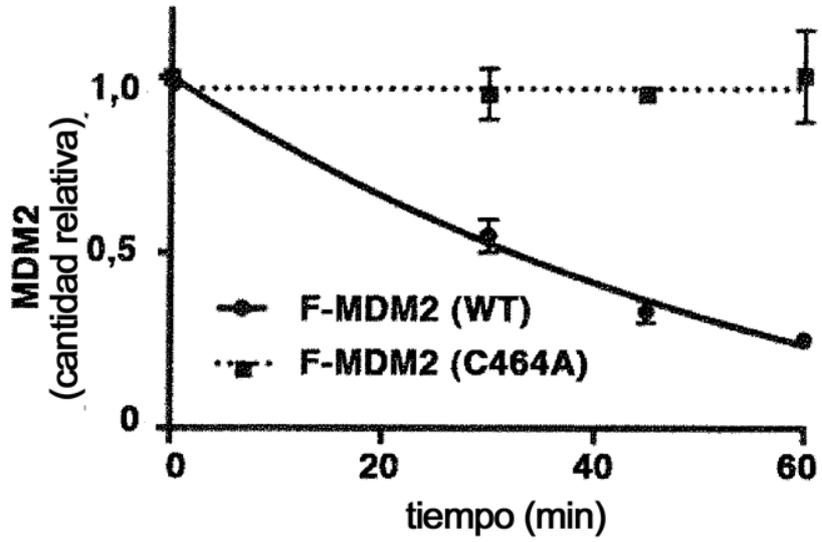
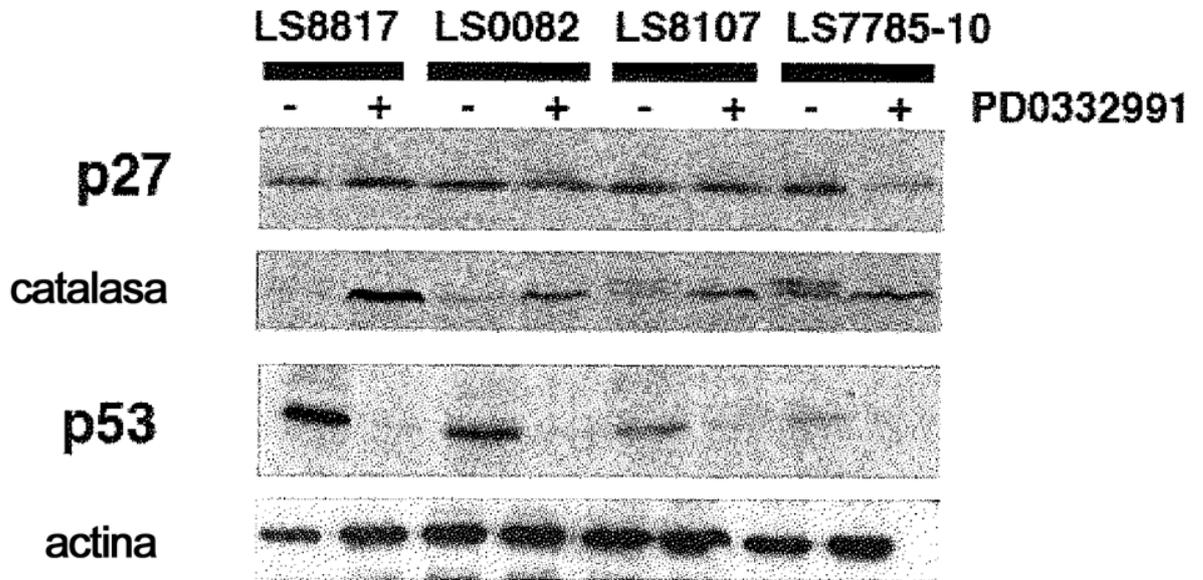
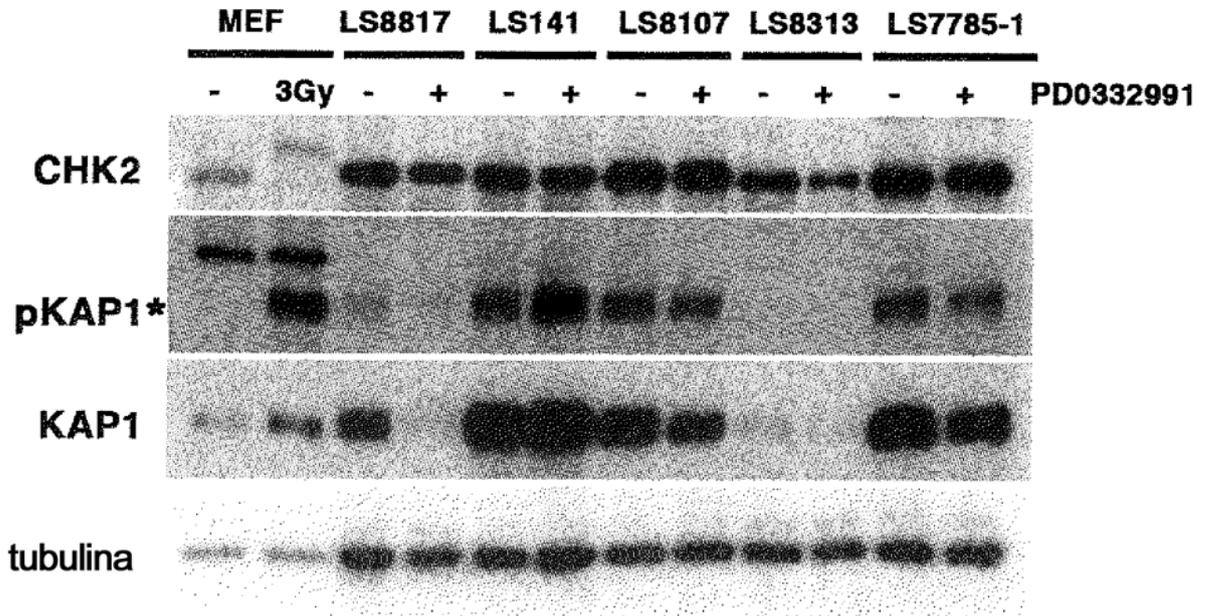


FIGURA 22



FIGURAS 23A-B

A



B

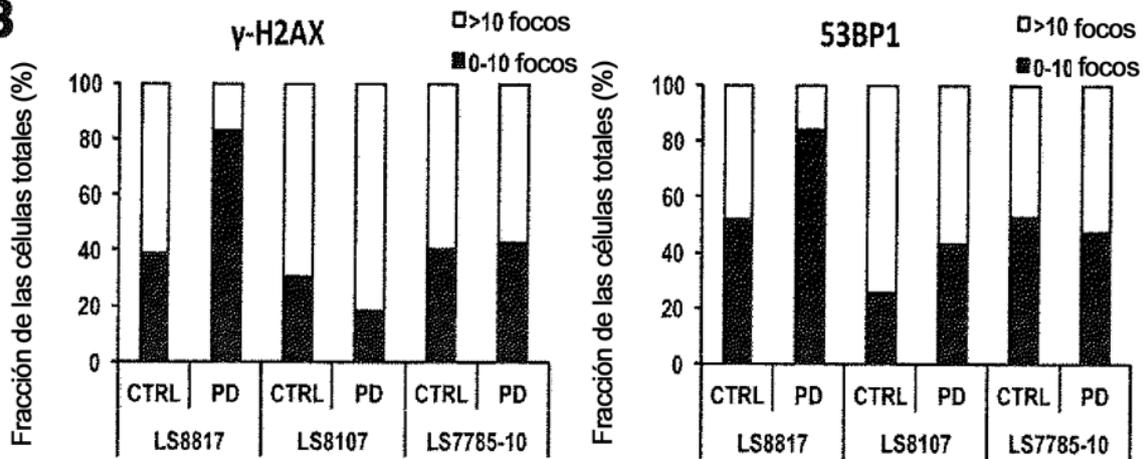


FIGURA 24

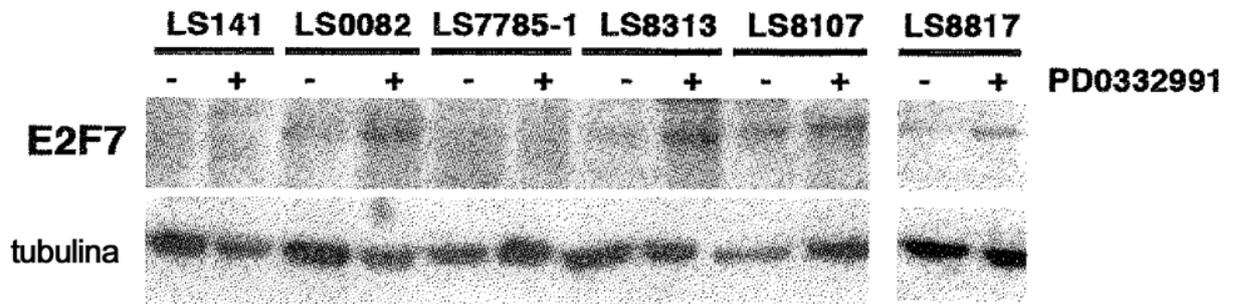


FIGURA 25A

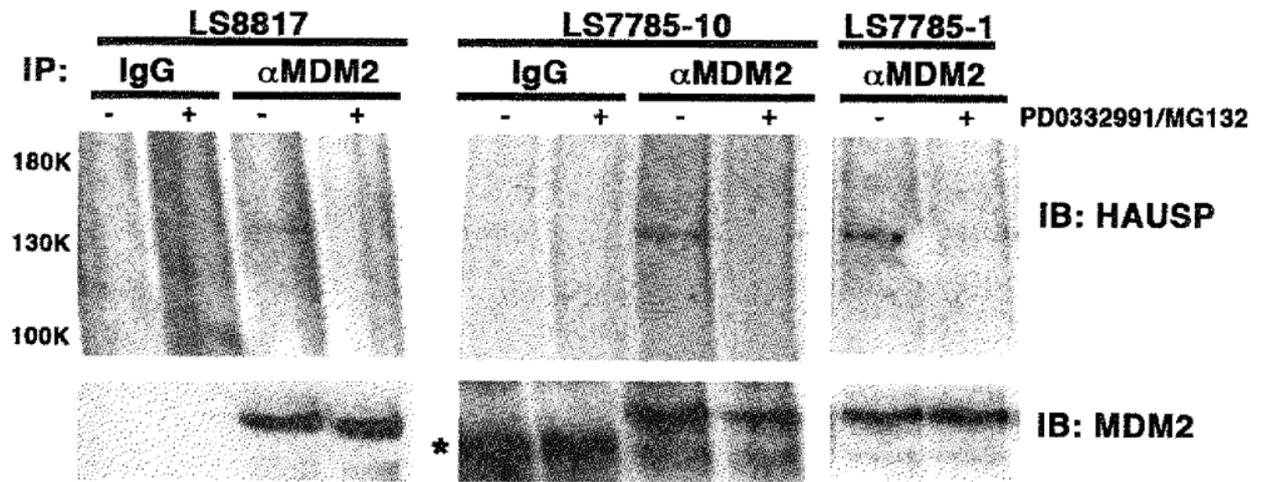


FIGURA 25B

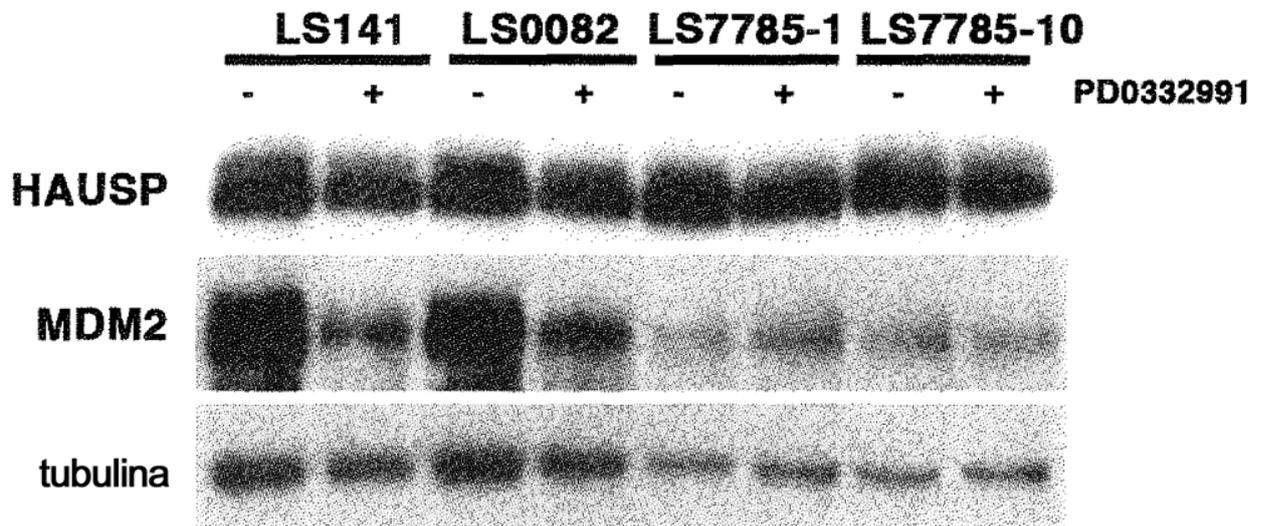


FIGURA 25C

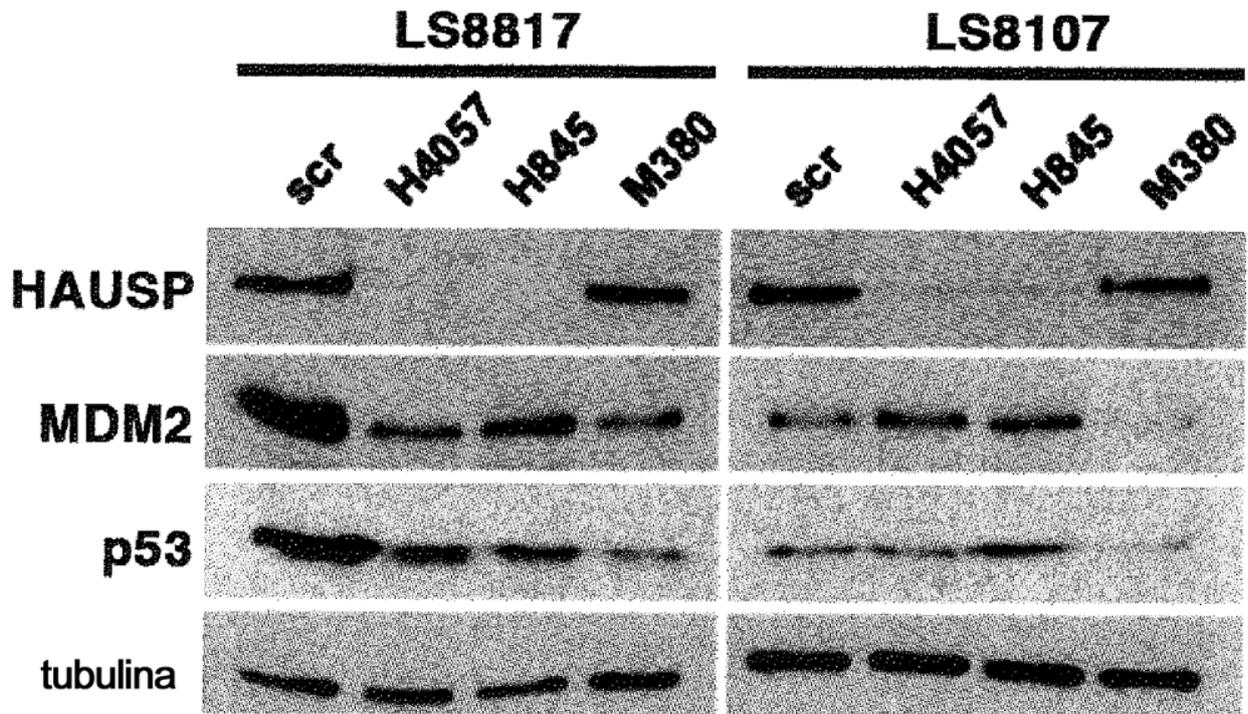
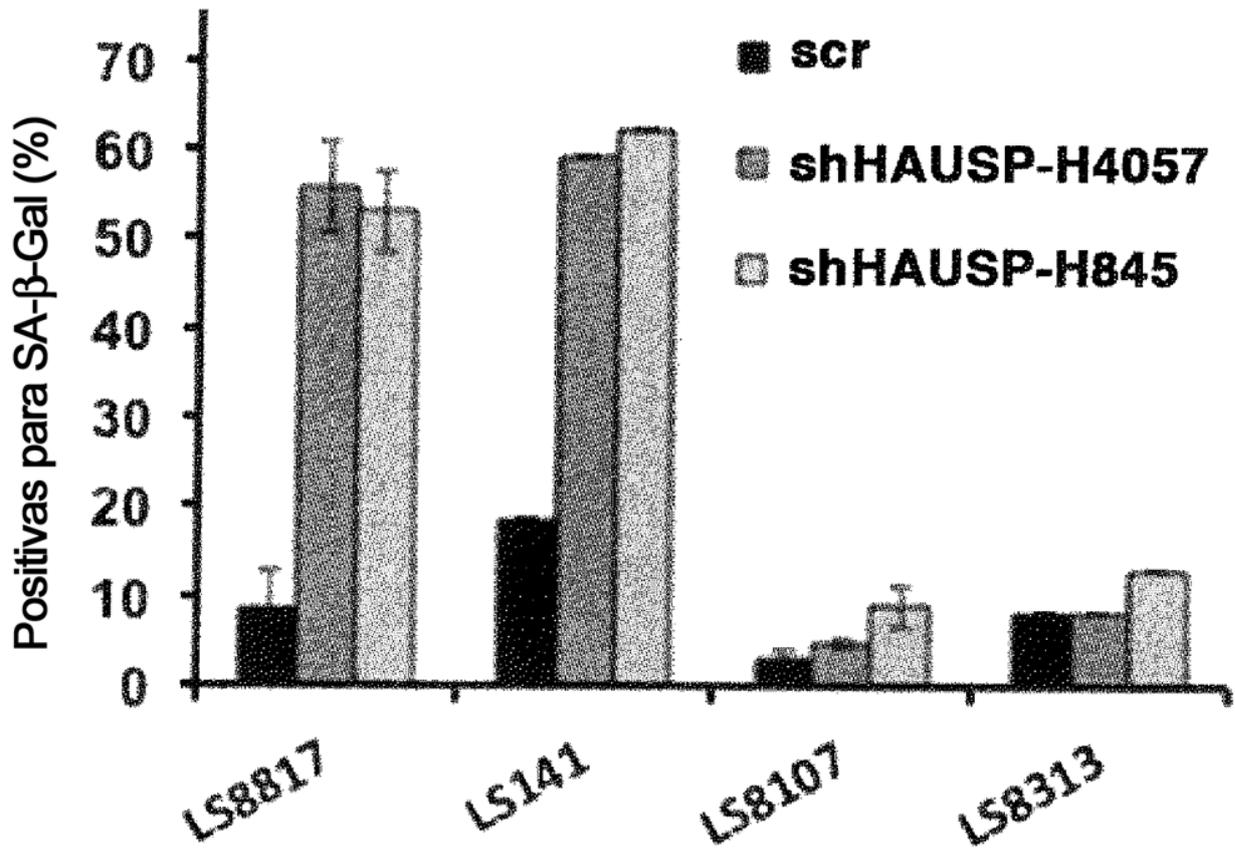


FIGURA 25D



FIGURAS 26A-B

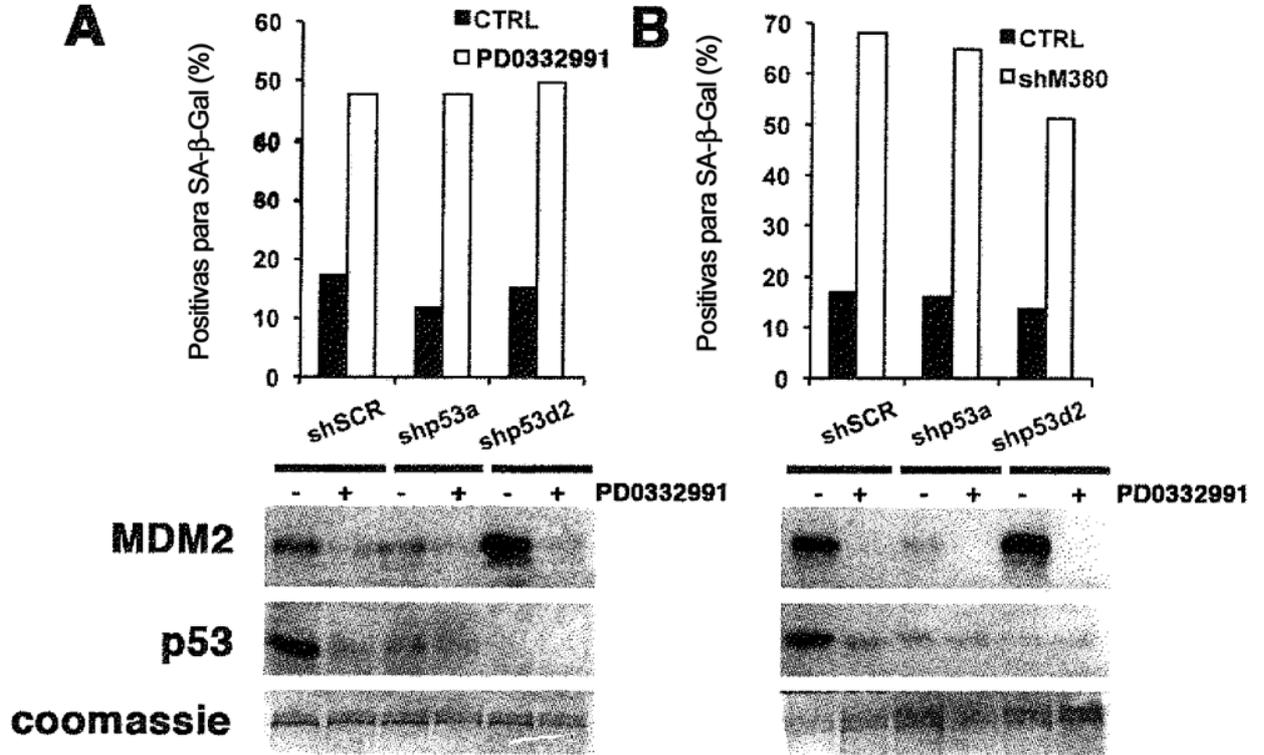


FIGURA 27

