

TESIS DOCTORAL



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE NUEVAS
ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN
NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS**

Departamento de Medicina

Hematología

ANA ALICIA LÓPEZ IGLESIAS

2017

D. Enrique M. Ocio San Miguel, Doctor en Medicina, Investigador del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca y Médico Adjunto del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca,

Dña. Mercedes Garayoa Berrueta, Doctora en Ciencias Biológicas e Investigadora del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca,

D. Marcos González-Díaz, Doctor en Medicina, Investigador principal del Centro de Investigación del Cáncer, Jefe de Sección del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca y Profesor Titular de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICAN:

Que el trabajo realizado bajo nuestra dirección y tutoría por Dña. Ana Alicia López Iglesias titulado: *Evaluación preclínica de nuevas estrategias terapéuticas en neoplasias hematológicas*, reúne las condiciones de originalidad y calidad científica requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Salamanca a 29 de Mayo de 2017.

Fdo.

Dr. Enrique M. Ocio

Dra. Mercedes Garayoa

Dr. Marcos González-Díaz

Siempre ten presente que la piel se arruga, el pelo se vuelve blanco,
los días se convierten en años...
pero lo importante no cambia; tu fuerza y tu convicción no tienen edad.
Tu espíritu es el plumero de cualquier tela de araña.
Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.
Detrás de cada logro, hay otro desafío.
Mientras estés viva, siéntete viva.
Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.
No vivas de fotos amarillas...
Sigue aunque todos esperen que abandones.
No dejes que se oxide el hierro que hay en ti.
Haz que en vez de lástima, te tengan respeto.
Cuando por los años no puedas correr, trota.
Cuando no puedas trotar, camina.
Cuando no puedas caminar, usa el bastón.
¡¡ Pero nunca te detengas !!!

Santa Teresa de Calcuta

ABREVIATURAS

AIF	Apoptosis-inducing factor.
Akt	v-akt murine thymoma viral oncogene.
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1.
Bad	Bcl-2-Antagonist of Cell Death.
Bak	Bcl2 Antagonist Killer.
Bax	Bcl2 Associated-X Protein.
Bcl-xL	Bcl-2 Related Protein Long Isoform.
Bcl-2	B-Cell CLL/Lymphoma-2.
BER	Base-excision repair.
Bid	BH3 Interacting Domain Death Agonist.
Bim	Bcl2-Interacting Protein BIM.
BMSC	Bone Marrow stroma cell
BRCA1	Breast Cancer, Early onset 1.
BRCA2	Breast Cancer, Early onset 2.
Caspases	Cysteine Aspartate-specific Proteases.
CCN	Cyclin / Ciclina.
CDKs	Cyclin-Dependent Kinases.
CFU	Colony forming unit.
CME	Célula mesenquimal estromal.
CMH	Célula madre hematopoyética.
C-myc	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog.
CN	Cariotipo Normal.
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12.
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) Receptor 4.
DED	Death Effector Domain.
DDR	DNA Damage Response.
Diablo	Direct IAP Binding protein with Low pl.
DISC	Death-Inducing Signalling Complex.
DSB	Double Strand break.
EndoG	Endonuclease G.
Erk 1/2	Extracellular Signal Regulated Kinase-1/2.
FADD	Fas Associated Death Domain.

FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor-1.
FLT-3	fms-like Tyrosine Kinase 3.
GADD45	DNA Damage-Inducible Gene-GADD45.
HATs	Histone Acetyl Transferases.
HDACs	Histone Deacetylases.
HR	Homologous recombination.
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Proteins.
IGHV	Inmunoglobulin heavy chain variable region
Igs	Inmunoglobulinas
IkB	Inhibitor of kappaB kinase.
IMiDs	Immunomodulatory drugs.
ITD	Internal Tandem Duplication.
JAK	Janus Kinase.
KIP	Kinase Inhibitor Protein.
LAM	Leucemia Aguda Mieloblástica.
LBM	Linfocitosis B Monoclonal
LLC	Leucemia Linfática Crónica.
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase.
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia-1.
Mdm-2	Mouse Double Minute-2.
MMP-9	Matrix Metalloproteinase-9.
MMSET	Multiple Myeloma SET domain protein.
MRN	Complejo formado por MRE-11, Rad 50 y Nibrin (NSB).
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.
MUC-1	Mucin-1-Transmembrane.
NER	Nucleotide excision repair.
NF-kB	Nuclear Factor-Kappa B.
NHEJ	Non-Homologous End Joining.
NK	Natural Killer.
NPM1	Nucleophosmin.
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase.
pBMSC	Patient bone marrow stroma cells.
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen.
PI3K	Phosphatidyl Inositol-3 kinase.

PKC	Protein Kinase-C.
Raf	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene.
Ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene.
Rb	Retinoblastoma.
RC	Remisión Completa.
RP	Respuesta Parcial.
SDF-1α	Stromal Cell Derived Factor-1.
SLP-B	Síndromes linfoproliferativos- B
Smac	Second Mitochondria-derived Activator of Caspase.
SSB	Single strand break.
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription.
TNF	Tumor Necrosis Factor.
TNF-R	Tumor Necrosis Factor Receptor.
TRADD	TNFR-associated death domain protein.
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand.
TRAIL-R	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor.
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1.
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor.
XIAPs	X-linked Inhibitor of Apoptosis Proteins.

INTRODUCCIÓN

1. HEMATOPOYESIS NORMAL	3
2. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	5
2.1 MIELOMA MÚLTIPLE (MM)	5
2.2 LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA (LLC)	8
2.3 LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA (LMA)	10
3. MECANISMOS ONCOGÉNICOS RELEVANTES EN EL TRATAMIENTO DE LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	12
3.1 MECANISMOS DE MUERTE CELULAR	14
3.1.1 MUERTE CELUAR PROGRAMADA O APOPTOSIS	14
3.1.2 MUERTE INDEPENDIENTE DE CASPASAS O NECROSIS “PROGRAMADA”	20
3.1.3 AUTOFAGIA	22
3.2 CICLO CELULAR	24
3.2.1 REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR	25
3.3 DAÑO Y REPARACIÓN DEL ADN	29
3.3.1 CONDICIONES Y AGENTES INDUCTORES DE DAÑO SOBRE EL ADN.....	29
3.3.2 TIPOS DE LESIONES SOBRE EL ADN	30
3.3.3 MECANISMOS DE REPARACIÓN DE DAÑO SOBRE EL ADN	30
3.4 EPIGENÉTICA	35
3.4.1 METILACIÓN DEL ADN.....	35
3.4.2 MODIFICACIONES DE HISTONAS	35
3.4.3 MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR ARN NO CODIFICANTE	36
3.5 VÍA UBIQUITINA-PROTEASOMA	37
3.6 VÍA NF-KB	39
3.7 RECEPTORES TIROSINA QUINASA	39
3.8 VÍA RAS/ RAF/ MEK/ ERK	41
3.9 VÍA PI3K/ AKT/ mTOR	41
3.10 VÍA JAK / STAT	44
3.11 VÍA DE LAS PIM QUINASAS	46
4 FÁRMACOS	46
4.1 MLN9708- IXAZOMIB	47
4.2 ZALYPSIS	47

4.3 EDO-S101	48
4.4 PIM447	49

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS	53
2. OBJETIVOS	55

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CÉLULAS	59
1.1 LÍNEAS CELULARES	59
1.2 CÉLULAS DE PACIENTES	63
2. FÁRMACOS Y CONTROLES	63
3. MEDIDA DE LA VIABILIDAD CELULAR	64
4. CO-CULTIVO CON CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES	65
5. ESTUDIO DEL CICLO CELULAR.....	66
6. MEDIDA DE LA APOPTOSIS	67
6.1 LÍNEAS CELULARES	67
6.2 CÉLULAS DE PACIENTES	68
7. DETECCIÓN DE LA PÉRDIDA DE POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	69
8. WESTERN BLOT	70
8.1 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA.....	70
8.2 CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE LOS EXTRACTOS CELULARES.....	71
8.3 ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA.....	71
8.4 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT: BLOQUEO, MARCAJE CON ANTICUERPOS Y REVELADO	72
8.5 EXTRACCIÓN PROTEICA DE LAS FRACCIONES CITOSÓLICA, MITOCONDRIAL Y NUCLEAR.....	73
9. ENSAYO COMETA	74

10. RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA (HR).....	77
11. ESTUDIO DE COMBINACIONES	77
12. SEPARACIÓN CELULAR	78
13. “WESTERN SIMPLE”	79
14. MODELOS MURINOS	81
14.1 MODELO DE PLASMOCITOMA SUBCUTÁNEO	81
14.2 MODELO DISEMINADO DE MM.....	82
14.3 MODELO MURINO DE LMA.....	82
15. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO	83

CAPÍTULO I. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA PRECLÍNICA DE FÁRMACOS CON NUEVOS MECANISMOS DE ACTUACIÓN EN DIVERSAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

1. MLN-9708 (IXAZOMIB).....	87
2. EDO-S101 (NL-101)	94
3. ZALYPSIS (PM-104).....	97
4. PIM447	99
5. DISCUSIÓN	100

CAPÍTULO II: ESTUDIO DE LA EFICACIA PRECLÍNICA DE EDO-S101 EN MIELOMA MÚLTIPLE

1. ANÁLISIS DE LA EFICACIA DE EDO-S101 IN VITRO Y EX VIVO....	103
2. ESTUDIO DE LA EFICACIA ANTI MIELOMA DE EDO-S101 EN UN MODELO DE MIRICROAMBIENTE DE MM	106
3. ANÁLISIS IN VITRO DE LAS PROPIEDADES FARMACOLÓGICA DE EDO-S101 COMO ALQUILANTE Y COMO INHIBIDOR DE HISTONA DEACETILASA.....	108

4. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE EDO-S101 EN EL CICLO CELULAR Y EN LOS MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS.....	111
5. ANÁLISIS DE LA INHIBICIÓN DE LA REPARACIÓN DEL ADN MEDIANTE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA INDUCIDA POR EDO-S101	116
6. ESTUDIO DE LA EFICACIA <i>IN VIVO</i> DE EDO-S101 EN VARIOS MODELOS MURINOS DE MM	121
7. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE EDO-S101 EN COMBINACIÓN CON OTROS FÁRMACOS CON EFECTO ANTI MIELOMA.....	125
8. ANÁLISIS DE EFICACIA DE EDO-S101 EN MM. DISCUSIÓN.....	128

CAPÍTULO III. ESTUDIO PRECLÍNICO DE LA EFICACIA DE EDO-S101 EN MONOTERAPIA Y EN COMBINACIÓN EN LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA

1. ANÁLISIS DE LA EFICACIA DE EDO-S101 EN LMA	133
2. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA <i>IN VIVO</i> DE EDO-S101 EN UN MODELO MURINO DE LMA	135
3. ANÁLISIS DE LA EFICACIA DE EDO-S101 EN COMBINACIÓN CON OTROS FÁRMACOS CON EFECTO ANTI LEUCEMIA	137
4. ANÁLISIS DE LA EFICACIA DE EDO-S101 EN LMA. DISCUSIÓN. .	143

CAPÍTULO IV. EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA COMBINACIÓN ZALYPSIS + BORTEZOMIB + DEXAMETASONA EN MIELOMA MÚLTIPLE

1. ESTUDIOS DE EFICACIA DE LA COMBINACIÓN ZALYPSIS + BOTEZOMIB + DEXAMETASONA IN VITRO Y EX VIVO	146
2. ESTUDIOS IN VIVO DE ZALYPSIS + BORTEZOMIB + DEXAMETASONA EN MODELOS MURINOS DE MM.....	149

3. ANÁLISIS DEL MECANISMO DE DE ACCIÓN DE LA TRIPLE COMBINACIÓN ZALYPSIS + BORTEZOMIB + DEXAMETASONA.....	155
4. EFICACIA DE LA TRIPLE COMBINACIÓN ZALYPSIS + BORTEZOMIB + DEXAMETASONA EN MM. DISCUSIÓN.....	164

CAPÍTULO V. ESTUDIO PRECLÍNICO DE LA EFICACIA DEL INHIBIDOR DE PIM QUINASAS PIM447 EN LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

1. ESTUDIO DE EFICACIA EN LÍNEAS CELULARES DE LLC DE PIM447.....	169
2. ANÁLISIS DE LA EFICACIA DE PIM447 EN CÉLULAS B PATOLÓGICAS DE PACIENTES CON LLC.....	170
3. ESTUDIO DE TOXICIDAD DE PIM447 EN LINFOCITOS T	173
4. ESTUDIO DE LA SINERGIA DE PIM447 CON OTROS FÁRMACOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA LLC	175
5. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES PROTEICOS DE PIM2 EN LINFOCITOS B MONOCLONALES Y LA RESPUESTA A PIM447.....	177
6. EFICACIA DE PIM447 EN LLC. DISCUSIÓN.....	180

DISCUSIÓN FINAL	183
------------------------------	------------

CONCLUSIONES.....	189
--------------------------	------------

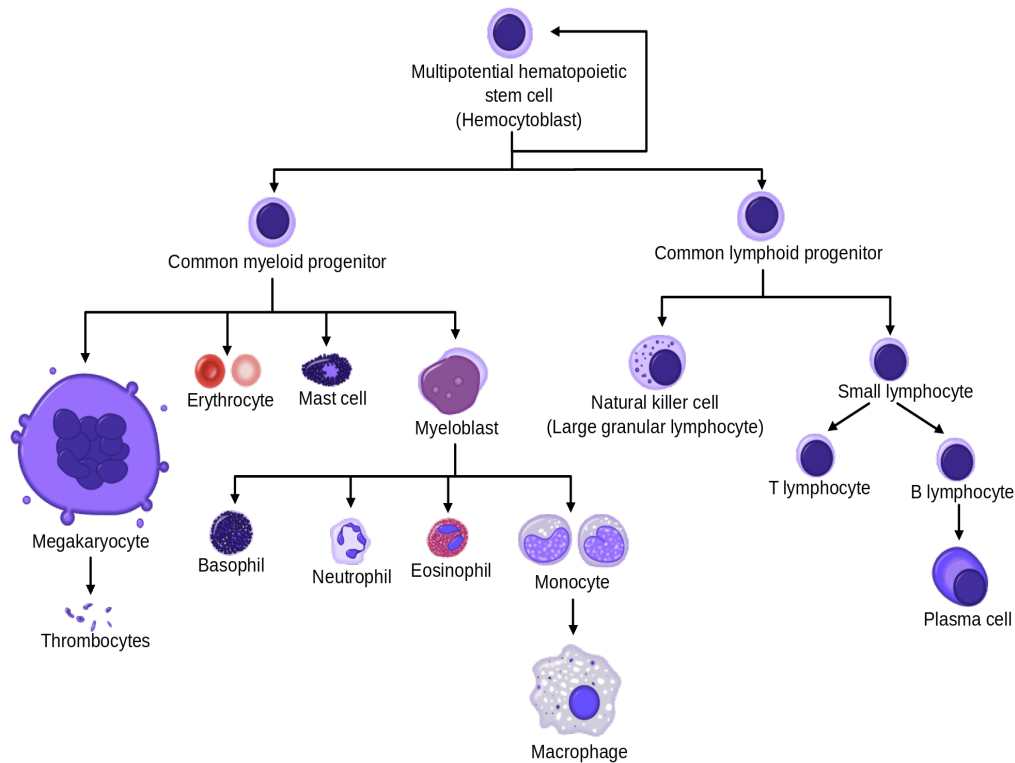
BIBLIOGRAFÍA.....	192
--------------------------	------------

INTRODUCCIÓN

1. HEMATOPOYESIS NORMAL

La médula ósea (MO), y más concretamente la epífisis de los huesos largos, junto a los espacios inter trabeculares del esqueleto axial (diploe, esternón, vértebras, ilíacos) conforman el tejido hematopoyético por excelencia del adulto, donde coexisten células maduras funcionalmente comprometidas con sus precursores. El más inmaduro de estos últimos sería la célula madre (o *stem cell*) hematopoyética (CMH), con capacidad de proliferación, diferenciación y auto-renovación. En 1976, Till y McCulloch demostraron la existencia de esta célula al inyectar médula ósea a un ratón previamente irradiado y confirmar que en el bazo se producían nódulos de células hematopoyéticas de todas las estirpes. Esta CMH posee capacidad formadora de colonias *in vitro* (CFU: colony forming unit) dando lugar a una colonia de células maduras y similares entre sí. Estas colonias formadoras se nombran en función de que hayan adquirido o no modificaciones genéticas y expresión de determinadas moléculas que las obligan a multiplicarse y producir unos u otros tipos de células sanguíneas concretas. Así por ejemplo, la célula que es capaz de dar lugar a los granulocitos neutrófilos y a los monocitos se llama CFU-GM; la que da origen a los linfocitos B y T es la CFU-L y la que da origen solamente a los linfocitos B es la CFU-B (Figura 1).

Figura 1 Diferenciación de la célula madre hematopoyética



Ambreen Shaikh and Deepa Bhartiya. Blood, 2012

En este proceso hacia la diferenciación celular y compromiso funcional final, además de participar la CMH, juega un papel fundamental el estroma y el microambiente hematopoyético, formado por fibroblastos, adipocitos, macrófagos, células endoteliales y células reticulares adventiciales. En el caso del microambiente existe también un progenitor común, la célula (o stem cell) mesenquimal de la que proceden la mayor parte de las células del estroma excepto los macrófagos, que derivan de precursores mieloides monocitarios. El papel de estas células es imprescindible en la diferenciación hematopoyética normal y su papel es doble. Por un lado producen la matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágeno, etc.) que sirve de apoyo a las células hematopoyéticas, y también producen moléculas de adhesión, que sirven de control a la salida de las células desde la médula ósea a la sangre periférica (selectinas, integrinas, etc.). Por otro lado producen citocinas, que son sustancias biológicas que influyen de manera autocrina o paracrina sobre el comportamiento celular, actuando en múltiples lugares y no siempre con la

misma función. Algunos ejemplos de citocinas son los factores de crecimiento hematopoyético, como el G-CSF (factor estimulador de colonias granulocíticas), EPO (eritropoyetina) o trompoyetina, que favorecen la diferenciación y proliferación de determinados tipos de células sanguíneas.

En el camino hacia la diferenciación hematopoyética normal pueden producirse alteraciones en el equilibrio del microambiente, así como producirse y acumularse diferentes alteraciones genéticas y moleculares en la célula hematopoyética, diferenciada o no, que darán origen o predisposición al desarrollo de distintas neoplasias hematológicas.

2. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

El término neoplasia hematológica engloba los diversos tipos de proliferaciones tumorales de las células sanguíneas o de sus precursores localizados en la médula ósea y en los órganos linfoides. Se han definido dos grandes categorías de neoplasias hematológicas en función de la línea hematopoyética afecta: las neoplasias mieloides¹ y las neoplasias linfoides.²

Las neoplasias mieloides afectan primariamente a la médula ósea y se extienden a la sangre periférica, mientras que los linfomas se originan en los diferentes tejidos linfoides (ganglios linfáticos, tejido linfoide asociado a mucosas o bazo) pudiendo infiltrar la médula posteriormente. En el caso del mieloma el origen de la célula tumoral continúa siendo objeto de controversia.

A continuación se describen con más detalle algunas de las neoplasias hematológicas con un papel preponderante en el presente trabajo de investigación: tanto de origen linfoide como el mieloma múltiple (MM) y la leucemia linfática crónica (LLC); como de estirpe mieloides como la leucemia mieloblástica aguda (LMA).

2.1 MIELOMA MÚLTIPLE (MM)

El MM es una neoplasia linfoide de células plasmáticas, un tipo de

célula B madura encargada de la inmunidad humoral, y especializada en la producción y secreción de las inmunoglobulinas (Igs) o anticuerpos. El MM se caracteriza por una acumulación incontrolada de células plasmáticas (CP) clonales en la médula ósea (MO), la producción de una inmunoglobulina monoclonal detectable en suero y/o orina, y la invasión de la médula ósea por células plasmáticas, desplazando la producción del resto de elementos formes de la sangre y favoreciendo la aparición de anemia, leucopenia o trombopenia; así como la aparición de lesiones osteolíticas secundarias a la alteración del microambiente medular que induce una actividad osteoclástica incontrolada.

Respecto a la etiopatogenia de la enfermedad se ha descrito que la célula plasmática sufre una serie de eventos oncogénicos: 1º translocaciones en los genes de las Igs; 2º inestabilidad cariotípica; 3º mutaciones somáticas, que conducen finalmente a su transformación tumoral.

Atendiendo a las alteraciones citogenéticas, la citogenética convencional suele ser con frecuencia no valorable por la falta de mitosis. El uso de la FISH evita este inconveniente habiéndose multiplicado el número de alteraciones citogenéticas detectadas desde que se usa esta técnica. Gracias a la FISH se han podido estudiar las translocaciones de la cadena pesada de las Igs, en la región 14q32. De éstas, dos se relacionan con un pronóstico adverso y son bastante específicas del MM, la t(4;14) y la t(14;16). La t(4;14) se encuentra en el 15% de los pacientes al diagnóstico, mientras que la t(14;16) sólo en el 5%. Otras translocaciones se han asociado con valor pronóstico favorable o neutral dependiendo de los estudios consultados, es el caso de la t(11;14), idéntica a la del linfoma del manto y presente en el 20% de los casos, y la t(6;14).³ La delección 17p13 es la alteración genética de mayor valor pronóstico y se considera un acontecimiento genético secundario o adquirido. Esta delección se asocia con peor pronóstico tanto con tratamiento convencional ⁴ como con autotrasplante,⁵ y se ha asociado a enfermedad extra medular y del sistema nervioso central.

Además, en esta enfermedad es clave la interacción de la célula plasmática y el estroma medular a la que se adhieren. Esta adhesión favorece la producción paracrina de citocinas como IL-6, TNF o IGF-1, que

ponen en marcha mecanismos de proliferación celular (especialmente a través de IL-6) y anti-apoptosis. Pero a su vez, la interacción entre célula plasmática y estroma favorece la producción de factores de activación osteoclástica que serán responsables de las lesiones óseas (osteólisis) que se producen en estos enfermos.

El MM es la segunda neoplasia hematológica más frecuente, con 2.000 nuevos casos diagnosticados cada año en España y 27.000 nuevos casos registrados en Estados Unidos durante el pasado año.⁶ La edad de aparición es alrededor de los 70 años con ligero predominio en hombres sobre mujeres (1.4-1). La mediana de supervivencia de estos pacientes ha pasado de 2 años hasta superar los 4-6 años en la última década,⁷ principalmente debido a las mejoras en el tratamiento de soporte, la introducción del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (auto-TAPH) y de otros agentes terapéuticos como la talidomida, la lenalidomida y el bortezomib, que se han convertido en parte de los nuevos estándares de tratamiento en MM. A pesar de recientes avances en el tratamiento de esta neoplasia, una vez que los pacientes se vuelven refractarios a los agentes disponibles su pronóstico es malo,⁷ por lo que se precisa continuar la investigación de nuevos agentes o combinaciones que en monoterapia o más frecuentemente en combinación sean capaces de vencer las resistencias y mejorar la eficacia. En este sentido un importante arsenal de nuevos compuestos con diferentes mecanismos de acción han sido evaluados en estudios preclínicos y muchos de ellos también en ensayos clínicos durante los últimos años (Tabla 1).⁸

Tabla 1. Nuevas moléculas ya aprobadas o en estudio en el tratamiento del mieloma múltiple

NUEVAS MOLÉCULAS	MECANISMO DE ACCIÓN
Carfilzomib, MLN 9708, marizomib	Inhibidores del proteasoma
IMiDs: pomalidomida, lenalidomida, talidomida	Inmunomoduladores
Daratumumab, Isatuximab, Pembrolizumab, Elotuzumab, Nivolumab, Siltuximab, Cetuximab	Anticuerpos monoclonales
BT062	Inmunotoxina
Perifosine, GSK 2110183, Afuresertib	Inhibidor de Akt
Vorinostat, Panobinostat, Romidepsina, ACY 1215	Inhibidor de HDAC
Arry-520 (Filanesib)	Inhibidor de la proteína KSP (Kinesin spindle protein)
Everolimus, Rad001	Inhibidores de mTOR
Hydroxichloroquine	Aggresoma , autophagia
Selumetinib, Trametinib	Inhibidor de Mek 1 / 2
Nuevos alquilantes	Melflufen, TH-302, EDO-S101

2.2 LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA (LLC)

La LLC está definida por la proliferación monoclonal de linfocitos B maduros que habitualmente co-expresan de forma patológica CD5 y CD23, y se caracteriza por una progresiva acumulación de linfocitos neoplásicos de aspecto maduro en sangre periférica (SP), MO, ganglios linfáticos y bazo, principalmente. Este acúmulo puede producir anemia y trombopenia secundarios a la invasión de la MO o derivadas de fenómenos autoinmunes. La aparición de linfocitos monoclonales B no inmunocompetentes desencadena una inmunidad, tanto humoral como celular, deficiente que

puede desencadenar infecciones graves, segundas neoplasias o los ya mencionados fenómenos autoinmunes.

Alrededor del 50% de los casos tienen mutaciones somáticas de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGVH), lo que sugiere su origen en células que han tenido contacto con antígenos en el centro germinal del folículo linfoide y, por lo tanto, tendrían memoria inmunológica. Frente a estos casos (que algunos han denominado LLC tipo II o post germinal), estaría otro grupo en los que los genes IGVH no estarían mutados, y en consecuencia, en estos enfermos la LLC surgiría a partir de células pre germinales (tipo I), sin memoria inmunológica. Estas dos variedades de una misma enfermedad tienen una historia natural diferente, puesto que las formas mutadas (más maduras) tienen mucho mejor pronóstico que las formas no mutadas.

Además, en el 80% de los pacientes se detectan alteraciones citogenéticas al diagnóstico. Las más frecuentes son la delección de 13q (gen RB) detectada en el 55% de los casos; delección de 11q (gen ATM) en el 18% de los casos; la trisomía 12 en el 16% y la delección de 17p (gen p53) detectada en el 7% de los casos de nuevo diagnóstico y que implica un pronóstico adverso.

La LLC es la leucemia del adulto más común en el mundo occidental, con una incidencia de 2-6 casos por cada 100.000 habitantes y más de 14.000 nuevos diagnósticos durante el último año en EEUU.⁶ En cuanto a las manifestaciones clínicas, más del 60% de los casos se diagnostican en fase asintomática y habitualmente es un examen rutinario de sangre el que establece la sospecha diagnóstica. En las formas sintomáticas, las manifestaciones clínicas están en relación con la acumulación de las células leucémicas en los tejidos y con una inmunodeficiencia asociada, siendo los síntomas más frecuentes: debilidad, fatiga, sudores nocturnos, fiebre, pérdida de peso, infecciones bacterianas y víricas e incluso tendencia al sangrado. En el examen físico, el hallazgo más típico son las adenopatías, y la afectación del bazo y el hígado también puede estar presente. A lo largo de la evolución de la enfermedad pueden aparecer fenómenos autoinmunes como anemia hemolítica autoinmune (AHAI), hipo-gammaglobulinemia, segundas neoplasias, transformaciones histológicas a linfoma de alto grado (síndrome

de Richter) y transformación prolinfocítica.⁹ Esta enfermedad puede presentar un curso clínico extremadamente variable, encontrando desde pacientes que sobreviven durante años, sin necesidad de tratamiento y que finalmente fallecen por otras causas, y pacientes con formas progresivas y rápidamente fatales, incluso tras la instauración de terapias agresivas y a pesar de la aparición de nuevos tratamientos como los anticuerpos monoclonales, el idelalisib (inhibidor del phosphatidylinositol 3-kinase), el ibrutinib (inhibidor de la tirosin quinasa de Bruton)¹⁰ y el venetoclax (inhibidor de BCL2).¹¹

2.3 LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA (LMA)

Las LAMs son un conjunto heterogéneo de enfermedades clonales originadas por un daño genético adquirido en una célula madre hematopoyética comprometida a estirpe mieloide, la cual pierde los mecanismos para diferenciarse normalmente y responder a los mecanismos reguladores de la proliferación. Esta pérdida provoca una acumulación de formas inmaduras (blastos) en la médula ósea, desplazando la hemopoyesis normal y provocando insuficiencia medular. Los blastos también se pueden acumular en otros tejidos, provocando manifestaciones extramedulares (por ejemplo, las leucémides o sarcomas granulocíticos).

Atendiendo a las alteraciones citogenéticas de las LMAs, existen algunas alteraciones recurrentes que se han asociado con buen pronóstico y que aparecen definidas como entidades en la última clasificación de la OMS: t (8;21), Inv16, t (15;17), NPM1 mutado, CEBPA mutado bialélico.¹² Y otras alteraciones citogenéticas que se asocian a peor pronóstico, como las monosomías del cromosoma 5 y del 7, deleciones de 5q y 7q, y otras anomalías en 11q23 o 3q6, o la duplicación en tándem de FLT3.¹³

Las LMA son las leucemias agudas más frecuentes en los adultos, con una prevalencia de 3,8 casos / 105 habitantes al año. La incidencia de las LAM aumenta con la edad, alcanzando los 17-20 casos / 105 habitantes al año en pacientes mayores de 65 años.¹⁴ La edad media de presentación es de 70 años, y existe un predominio masculino, con 3 varones afectados por cada 2 mujeres. El curso clínico de las LAMs suele ser agresivo, con un

intervalo de escasos días o semanas entre los primeros síntomas y el diagnóstico. Hasta mediados del siglo XX, las LMA eran consideradas enfermedades incurables, con resultados desesperanzadores con las terapias disponibles, con las cuales pocos pacientes alcanzaban remisiones completas y su supervivencia era muy corta.¹⁵ En los últimos 40 años varios fármacos han demostrado ser útiles en esta enfermedad y han establecido el tratamiento estándar de los pacientes afectados de LAM,¹⁶ que consiste en una combinación de citarabina en infusión continua durante 7 días y una antraciclina (daunorrubicina o idarrubicina) durante 3 días (régimen 3+7),^{17,18} con el que un 60-80% de los pacientes alcanzan una remisión completa, con una supervivencia a largo plazo en torno al 40%.¹⁹ Otras alternativas como dosis altas de antraciclinas o citarabina o adición de un tercer fármaco (análogos de purinas o inhibidores de topoisomerasas) no han confirmado sus teóricas ventajas sobre el tratamiento estándar.¹⁶ Además del esquema clásico, estos pacientes necesitan para mantener la respuesta, quimioterapia de consolidación, tratamientos de mantenimiento o trasplante de células madre hemopoyéticas, tanto autólogo como alogénico, ya que, sin este tratamiento intensivo, y a pesar de los progresos en el soporte transfusional y el tratamiento anti infeccioso, la mitad de los pacientes fallecen antes de 2 meses tras el diagnóstico y prácticamente ninguno alcanza el año de supervivencia. Aunque la investigación de nuevas moléculas no ha cesado, han sido pocos los beneficios en términos de supervivencia que estos nuevos fármacos han aportado. Algunas de las moléculas en estudio se enumeran en la (Tabla 2). Fármacos como la guadecitabine están aún en estudio en comparación con otros agentes hipometilantes en pacientes no candidatos a QT intensiva (NCT02348489). Entre los anticuerpos monoclonales conjugados con drogas anti leucemia destaca el Gemtuzumab ozagomicin, existiendo algunas publicaciones que le otorgan beneficio en la supervivencia en subgrupos específicos de pacientes.²⁰ Midostaurin, un inhibidor de FLT3 ha demostrado efecto anti leucemia en monoterapia tanto en pacientes con FLT3 mutado como no mutado²¹, por lo que actualmente se está estudiando en combinación con daunorrubicina y citarabina.

Tabla 2. Nuevas moléculas en estudio en el tratamiento de las LMAs

NUEVAS MOLÉCULAS	MECANISMO DE ACCIÓN
CPX-351	Formulación liposomal de citarabina más daunorrubicina (beneficio no estadísticamente significativo)
Vosaroxin	Molécula derivada de las quinolonas que inhibe la topoisomerasa II y no produce toxicidad cardíaca.
Guadecitabine (SGI-110)	Dinucleótido de decitabina y deoxiguanosina que incrementa la exposición in vivo a la decitabina protegiéndola de la degradación. En estudio.
Gemtuzumab ozagomicin	Anticuerpo monoclonal anti CD33 conjugado.
Volasertib	Inhibe la polo-like kinase 1 (PLK1), PLK2 y PLK3. PLKs son una familia de 5 serine/threonine kinases que son importantes para la regulación de los checkpoints y del ciclo celular.
Midostaurin, Quizatinib, Crenolanib, Gilteritinib,	Inhibidores de FLT3
Pracinostat	Inhibidor de histona deacetilasa

3. MECANISMOS ONCOGÉNICOS RELEVANTES EN EL TRATAMIENTO DE LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

La investigación terapéutica en oncología ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años, pasando de tratamientos basados en la quimioterapia convencional a la utilización de fármacos dirigidos frente a dianas específicas de la célula tumoral. En hematología, fármacos como el anticuerpo monoclonal anti-CD20 en los síndromes linfoproliferativos B, y el imatinib en la leucemia mieloide crónica (LMC), representan un paradigma de

este cambio. Sin embargo, a pesar de estos avances, muchos pacientes no responden a los tratamientos pautados o recaen tras un periodo de respuesta, debido a la presencia o desarrollo de resistencias. Por este motivo, es especialmente importante seguir buscando nuevas dianas terapéuticas y nuevos fármacos para estos pacientes refractarios.

Aunque la patogenia de las distintas neoplasias hematológicas es diferente y los mecanismos de resistencia también pueden serlo, existen características biológicas y vías oncogénicas comunes a estas enfermedades lo que nos permite estudiarlas de forma conjunta y comparativa a la hora de buscar moléculas eficaces en su tratamiento.

Existen diferentes mecanismos mediante los que una molécula puede inducir la muerte de una célula tumoral, y en base a esto distintas formas de muerte serían posibles. Algunos de estos mecanismos pueden ser la alteración del ciclo celular, la inducción de proteínas de muerte como las caspasas, el desequilibrio en el potencial de membrana mitocondrial o la inducción de daño sobre el ADN. Otros procesos serían más específicos como la inhibición de proteínas vitales de la célula tumoral o la inhibición de la reparación del daño celular. Otros, más concretos, serían los dirigidos contra una diana terapéutica específica de una neoplasia como el imatinib en la LMC. En suma son múltiples los mecanismos por los que se puede inducir la muerte celular, muchos de ellos aún desconocidos, y también son múltiples las vías de resistencia que presentan las células tumorales. Algunos de los aspectos que se estudian durante el desarrollo preclínico de nuevos agentes terapéuticos se centran en los mecanismos mencionados y se describen a continuación. Estos estudios nos ayudan a entender mejor el funcionamiento *in vivo* de los fármacos y a diseñar ensayos clínicos que combinen la nueva molécula con agentes ya en uso en base a su mecanismo de acción.

A continuación, se exponen algunos de los principales mecanismos frente a los que se han diseñado nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades oncológicas.

- Mecanismos de muerte celular: apoptosis, necrosis y autofagia
- Ciclo celular
- Daño en el ADN y respuesta a daño

- Epigenética
- Vías de supervivencia:
 - Vía ubiquitina-proteasoma
 - Vía NF-kB
 - Receptores tirosina quinasa
 - Vía RAS / RAF / MEK / ERK
 - Vía PI3K / AKT / mTOR
 - Vía JAK /STAT
 - Vía de las PIM quinasas

3.1 MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

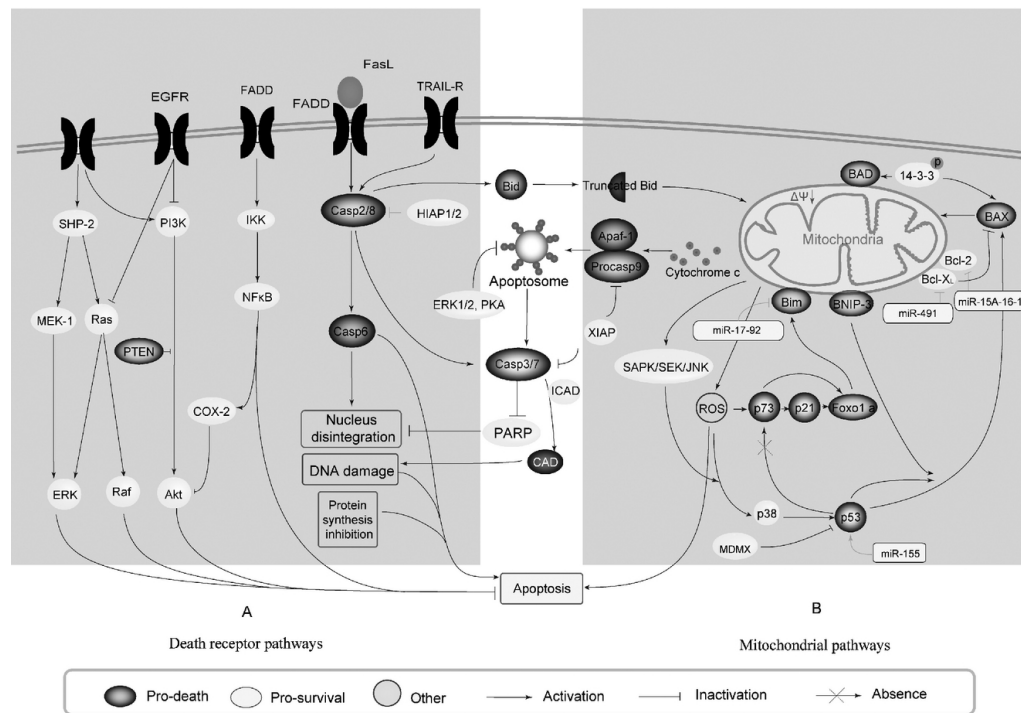
3.1.1 MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS

La apoptosis, descrita por primera vez por Kerr en 1972,²² es una forma de muerte celular programada como consecuencia del envejecimiento tisular y celular, o en respuesta a diferentes agentes externos como las radiaciones ionizantes y los agentes quimioterápicos.^{22,23,24} Puede considerarse como un proceso que facilita la eliminación de células defectuosas. Por tanto, la alteración en la regulación de los genes implicados en la muerte celular puede ser causa y estar asociada al desarrollo de diferentes neoplasias, enfermedades autoinmunes, infecciones virales y enfermedades neurodegenerativas, y también estar implicada en la respuesta a tratamiento de distintas enfermedades neoplásicas.^{24,25} La apoptosis es un proceso activo en el que inicialmente las células reaccionan ante un estímulo ejecutando ellas mismas el proceso de muerte programada.^{26,27} Durante la apoptosis la célula sufre cambios morfológicos asociados a una disminución de la adhesión y los contactos intercelulares, alteraciones del citoesqueleto, condensación de la cromatina nuclear, desintegración de los nucléolos, disminución del tamaño nuclear y condensación del citoplasma y orgánulos. Paralelamente se producen una serie de procesos bioquímicos en la célula que incluyen una disminución del potencial de membrana mitocondrial, pérdida de la asimetría en la composición de los fosfolípidos de la membrana plasmática, con la exposición al exterior de residuos de fosfatidilserina y

fragmentación del ADN, debido a la activación de endonucleasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} que cortan el ADN genómico por los espacios internucleosomales.^{28,29} Finalmente, se forman fragmentos nucleares recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos) que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria.³⁰

A nivel molecular, la apoptosis constituye una serie compleja de eventos con múltiples reguladores, tanto positivos como negativos, e integrada en otras vías intracelulares tan importantes como la progresión en el ciclo celular, las señales mediadas por fosforilación y la reparación de daño al ADN.³¹⁻³³ Se ha descrito que la apoptosis se lleva a cabo principalmente por dos vías distintas:²⁶ 1) la apoptosis mediada por receptores de muerte expresados en la superficie celular o vía extrínseca y 2) la apoptosis mediada por la mitocondria, también denominada vía intrínseca (Figura 2). La señalización por ambas vías induce la activación de miembros de una familia de proteínas conocidas como caspasas (caspases: Cysteine Aspartate-specific Proteases), que de forma específica cortan proteínas en los residuos de cisteína localizados próximos al ácido aspártico. Las caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) dan comienzo a una cascada de eventos que convergen dentro de una vía común de caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7) que conducen a la ejecución de la apoptosis, y que se traduce en los cambios bioquímicos y morfológicos característicos de este fenómeno, descritos anteriormente. Además, la vía intrínseca induce también muerte celular a través de una vía independiente de caspasas.²⁶ A continuación nos centraremos con más detalle en los mecanismos de ambas vías apoptóticas.

Figura 2. Vía extrínseca o mediada por receptores de muerte celular (death receptor pathway) y vía intrínseca mitocondrial (mitochondrial pathway)



L.Ouyang. Cell Proliferation, 2012

3.1.1.1 Vía extrínseca de la apoptosis o mediada por receptores de muerte celular

La vía extrínseca se llama así por ser activada por ligandos de la familia del TNF- α que al unirse a sus receptores en la membrana (extrínsecos) desencadenan la activación de caspasas y la apoptosis. Los así llamados, receptores de muerte celular se caracterizan por tener dominios extracelulares ricos en cisteína. Todos tienen en común un dominio DD (Death Domain) en la región citoplasmática. De forma general, la unión de ligandos a los receptores de muerte induce su trimerización, y el reclutamiento posterior de moléculas adaptadoras que activarán a la caspasa-8 y ésta, al ser activada, activará a su vez la caspasa-3. Los receptores de muerte mejor estudiados son Fas (Apo-1 o CD95), TNF-R

(Tumor Necrosis Factor Receptor) y TRAIL-R (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor).³⁴ Como se observa en la Figura 2, FADD puede activar la procaspasa-8, que a su vez, actúa sobre las caspasas efectoras. Simultáneamente, la caspasa-8 activa puede inducir la activación de BID, activando la vía mitocondrial.

- **Fas.** Fas/Apo-1/CD95 se expresa de forma ubicua en la superficie de la célula, es una proteína de membrana de 40 KDa, que está altamente expresada en linfocitos T y células NK (Natural Killer) activadas.³⁵ El sistema Fas/FasL participa en la eliminación de los linfocitos T y B de células infectadas por virus y de células cancerígenas. Esta vía se inicia por la formación del complejo DISC (Death-Inducing Signalling Complex), en el cual intervienen una molécula adaptadora llamada FADD 46 (Fas Associated Death Domain) y la procaspasa-8. La oligomerización de la pro caspasa-8 en el complejo DISC da lugar a la activación de la caspasa-8 y la posterior activación de otras caspasas. Dependiendo del tipo celular, la caspasa-8 puede directamente activar a la caspasa-3 o proteolizar el extremo carboxi-terminal de BID (BH 3 Interacting Domain Death Agonist), una proteína pro apoptótica de la familia de Bcl-2. La translocación de la forma truncada de BID a la mitocondria activará la vía mitocondrial.³⁵
- **TNFR.** Al igual que Fas, el receptor de tipo 1 para el TNF- α (TNFR1) se expresa de forma ubicua, en cambio su ligando TNF- α sólo se expresa en macrófagos activados y en linfocitos en respuesta a infecciones.³⁵ En la activación, TNF- α , se une a su receptor mediante trimerización de TNFR1. Posteriormente se une una molécula adaptadora, TRADD (TNFR-associated death domain protein), que induce la asociación con FADD y la activación de la caspasa-8. Además de la vía apoptótica, TNF- α induce otras vías de transducción de señales a partir de TRADD que desencadenan la activación de NF- κ B y JNK (c-Jun Kinase) / Ap-1.290. La demostración de que TNF- α podía eliminar selectivamente las células tumorales respetando las células sanas rápidamente llevó al optimismo, sin embargo, las

potentes capacidades inflamatorias del TNF- α , indujeron problemas de tolerancia tras su administración sistémica.³⁶

- **Receptores TRAIL.** Las células normales expresan TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), pero son resistentes a la muerte celular inducida por TRAIL. En cambio las células tumorales son sensibles a esta citocina. Se han descrito cuatro receptores al respecto, de los cuales dos (TRAIL-R1 o DR4 y TRAIL-R2 o DR5) inducen apoptosis y serían los que determinarían si una célula será resistente o sensible a TRAIL.³⁵

3.1.1.2 Vía intrínseca o mitocondrial: apoptosis desencadenada por señales internas

La apoptosis inducida por señales internas, se inicia en la mitocondria con la salida del citocromo C. Los mecanismos de lesión mitocondrial en respuesta a diferentes situaciones de estrés es un tema que se encuentra en debate. Sin embargo, la activación de Bax, mediada por p53, parece ser la versión más aceptada para explicar la activación mitocondrial inducida por estrés o señales internas.³⁷ Se ha demostrado que Bax se asocia con el complejo de poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (MPTPC). El MPTPC participa en la regulación del calcio, el pH, el potencial de la membrana ($\Delta\Psi_m$) y el volumen mitocondrial, funcionando como un canal aniónico. Se ha demostrado que la proteína pro apoptótica Bax puede inducir la apertura del poro que se localiza en la membrana interna mitocondrial, lo que conlleva un descenso en el $\Delta\Psi_m$ y la salida de factores apoptóticos entre los que se incluyen: el citocromo C, smac/diablo, el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G (Endo -G).

Siendo la apoptosis un proceso activo y estrictamente regulado, además de existir activadores de la vía mitocondrial como los ya mencionados, existen reguladores negativos como las proteína inhibidoras de apoptosis (IAPs), Bcl-2 y BclXL. Algunas de las proteínas más relevantes se detallan a continuación.

- **Citocromo-C.** Es una proteína que participa en la cadena de transporte de electrones y se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria. Cuando es liberada al citosol se une a la proteína APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) y a la procaspasa-9, formando un complejo llamado apoptosoma, induciendo la activación de la caspasa-9 y la cascada de activación de caspasas.³⁸
- **Familia Bcl-2.** La activación del apoptosoma se encuentra estrechamente controlada por proteínas de la familia Bcl-2 asociadas a la mitocondria, algunas de las cuales tienen actividad pro-apoptótica y otras son anti-apoptóticas. Las células están protegidas frente a los factores anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, los cuales limitan el reclutamiento de los componentes del apoptosoma. La familia Bcl-2 se divide en tres grupos según los dominios BH (Bcl-2 homology) que las integran³⁹ :
 - Proteínas anti-apoptóticas, que contienen los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4. Un ejemplo son Bcl-2 y Bcl-XL.
 - Proteínas pro-apoptóticas, que contienen los dominios BH1, BH2 y BH3. Bax y Bak pertenecen a este grupo.
 - Proteínas pro-apoptóticas que contienen únicamente el dominio BH3 (BH3 only). Ejemplos Bid, Bik y Bim.
- **Smac/Diablo** (second mitochondria-derived activator of caspase) se une por su extremo N-terminal a la mitocondria y en el espacio intermembranal se proteoliza dejando libre el dominio que le permite su unión con las IAPs y la inhibición de estas proteínas.³⁸ Debido a la pérdida del potencial mitocondrial, al mismo tiempo que se produce la liberación de se libera Smac/Diablo que se une a las IAPs (XIAP, c-IAP1, c-IAP2 y survivina) en el citoplasma y las bloquea, inhibiendo su función y potenciando la activación de caspasas y la vía de apoptosis mitocondrial.⁴⁰ La liberación de Smac/Diablo es inhibida por Bcl-2 y BclXL.⁴¹
- **IAPs (proteínas inhibidoras de apoptosis).** Estas proteínas tienen la capacidad de inhibir la apoptosis mediante la unión selectiva e

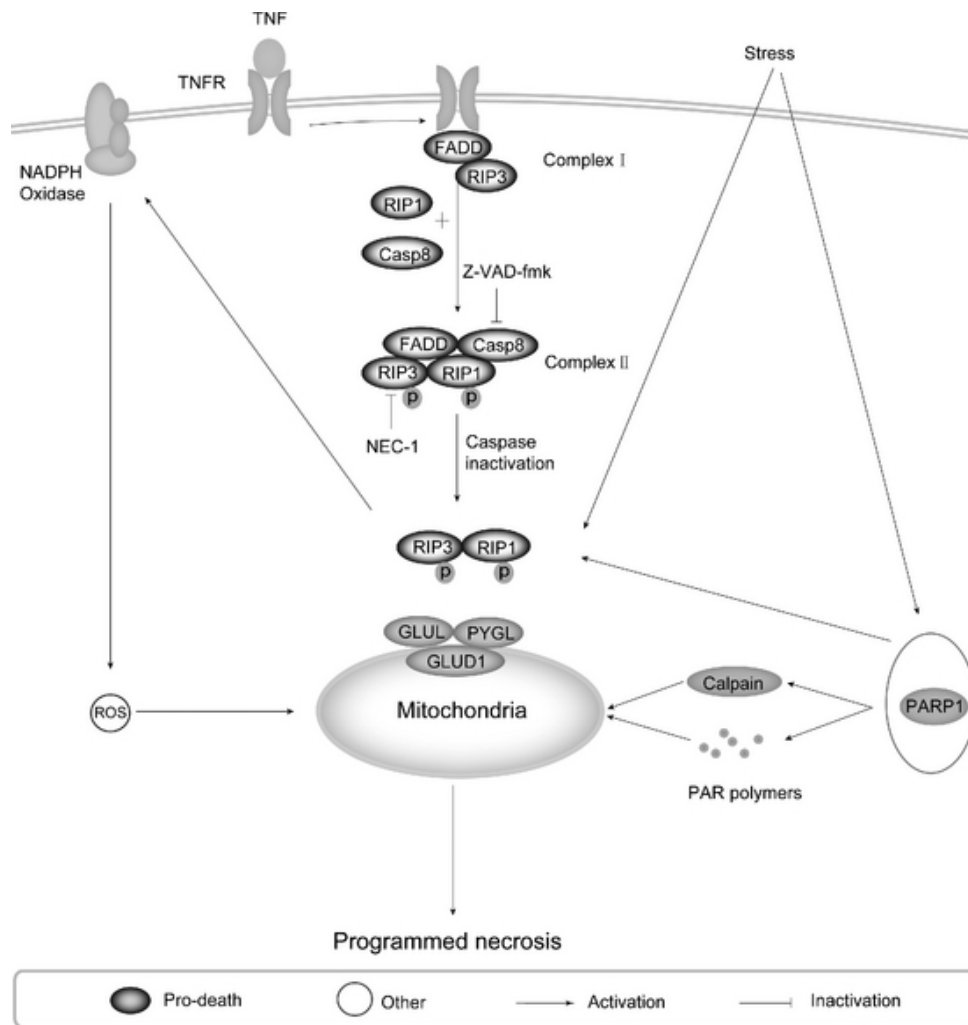
inhibición de la actividad de caspasas. Los IAPs bloquean la cascada de caspasas e inhiben la muerte celular en respuesta a estímulos pro-apoptóticos. Su acción es bloqueada por smac/diablo.⁴²

- **AIF (Apoptosis Inducing Factor)**. AIF es una proteína altamente conservada filogenéticamente y esencial para el desarrollo embrionario. Como Smac, se sintetiza en forma de precursor inmaduro, se transloca a la mitocondria y en el espacio intermembrana se proteoliza. En respuesta a señales de muerte, AIF sale de la mitocondria y se traslada a través del citosol hasta el núcleo, donde se une al ADN provocando condensación de la cromatina y fragmentación del ADN en fragmentos de aproximadamente 50 Kb.⁴³
- **Endonucleasa-G (Endo-G)** es una proteína esencial para la replicación del ADN mitocondrial. Se aisló a partir de la fracción mitocondrial tratada con la forma activa pro-apoptótica de Bid: tBid. Una vez liberada al citosol se traslada al núcleo donde fragmenta el ADN, incluso en presencia de inhibidores de caspasas. Endo-G coopera con la exonucleasa y ADNasa facilitando el procesamiento del ADN.⁴⁴
- Finalmente, **PARP-1**, es uno de los numerosos sustratos de las caspasas y que puede ser procesado por todas ellas. La importancia del procesamiento de PARP-1 por las caspasas hace que sea considerado un marcador de apoptosis. Bajo condiciones basales la principal función de PARP-1 es detectar daño en el ADN e intentar poner en marcha la reparación de éste. Las caspasas como efectoras de la muerte celular programada, lo que hacen es procesar PARP-1 para inactivarla y evitar esta reparación.⁴⁵

3.1.2 MUERTE INDEPENDIENTE DE CASPASAS O NECROSIS “PROGRAMADA”

Algunos estudios enumerados a continuación han profundizado en otros tipos de muerte como la necrosis “programada” (Figura 3).

Figura 3. Muerte independiente de caspasas o necrosis programada



L.Ouyang. Cell Proliferation, 2012

Continuando con la proteína PARP-1 las células que presenta daño severo del ADN expresan una amplificación de PARP-1 que resulta en el consumo excesivo de NAD⁺ y ATP, lo que induce según algunas teorías y estudios la translocación de AIF desde la mitocondria hasta el núcleo induciendo la fragmentación del ADN y la muerte celular independiente de caspasas.⁴⁶ En otras ocasiones, especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros agentes inductores de daño sobre el ADN puede alterar la permeabilidad mitocondrial permitiendo también la liberación de AIF y Endo-G, desencadenando también la necrosis “programada”.⁴⁷ Por otro lado, tras la activación de los receptores de muerte celular de membrana (como TRAIL o FASL), la consecuente activación de la caspasa-8 que se produce en

circunstancias normales, puede ser inhibida por sustancias como el Z-VAD-FMK, o por la infección por cepas virales que codifiquen para serpinas.⁴⁷

El avance en el conocimiento de estos mecanismos desencadenantes de necrosis ha revelado que se trata de un proceso no tan descontrolado como se creía inicialmente, sino un mecanismo de muerte con una sucesión de eventos variables pero sucesivos, por lo que muchos autores lo han denominado necrosis “programada”. No obstante, el resultado final de la necrosis se diferencia principalmente de la apoptosis en que en el caso de la apoptosis se produce una fragmentación celular en cuerpos apoptóticos rodeados cada uno por membrana celular, mientras que en el caso de la necrosis se produce una ruptura de la membrana celular y la liberación del contenido celular lo que desencadena una respuesta inflamatoria en la zona afectada.

3.1.3 AUTOFAGIA

La autofagia se conoce desde hace más de 50 años, pero su importancia en la fisiología y en la medicina no fue reconocida hasta la década de 1990, gracias a los descubrimientos del Dr. Yoshinori Oshumi, premio Nobel de medicina en el año 2016. Oshumi estudió la función de las proteínas codificadas por los genes clave en la autofagia y delineó cómo las señales de estrés inician la autofagia. También describió el mecanismo por el cual las proteínas y complejos de proteínas promueven los distintos procesos que constituyen la autofagia.^{48,49}

La autofagia es un mecanismo de supervivencia celular donde el exceso de orgánulos o aquellos deteriorados o aberrantes, son secuestrados en vesículas de doble membrana y liberados dentro del lisosoma/vacuola para su descomposición y eventual reciclado. Es por tanto un mecanismo que responde al estrés extra- o intra-celular, para restablecer el equilibrio intracelular. Sin embargo, una hiper-activación de los mecanismos de autofagia podrían también resultar en la muerte celular.⁵⁰ Por tanto, cuando analizamos la relación entre autofagia y cáncer, uno de los puntos clave es como determinar cuando la autofagia protege a la célula tumoral o cuando contribuye a su muerte. En el caso de algunos tumores hematológicos la

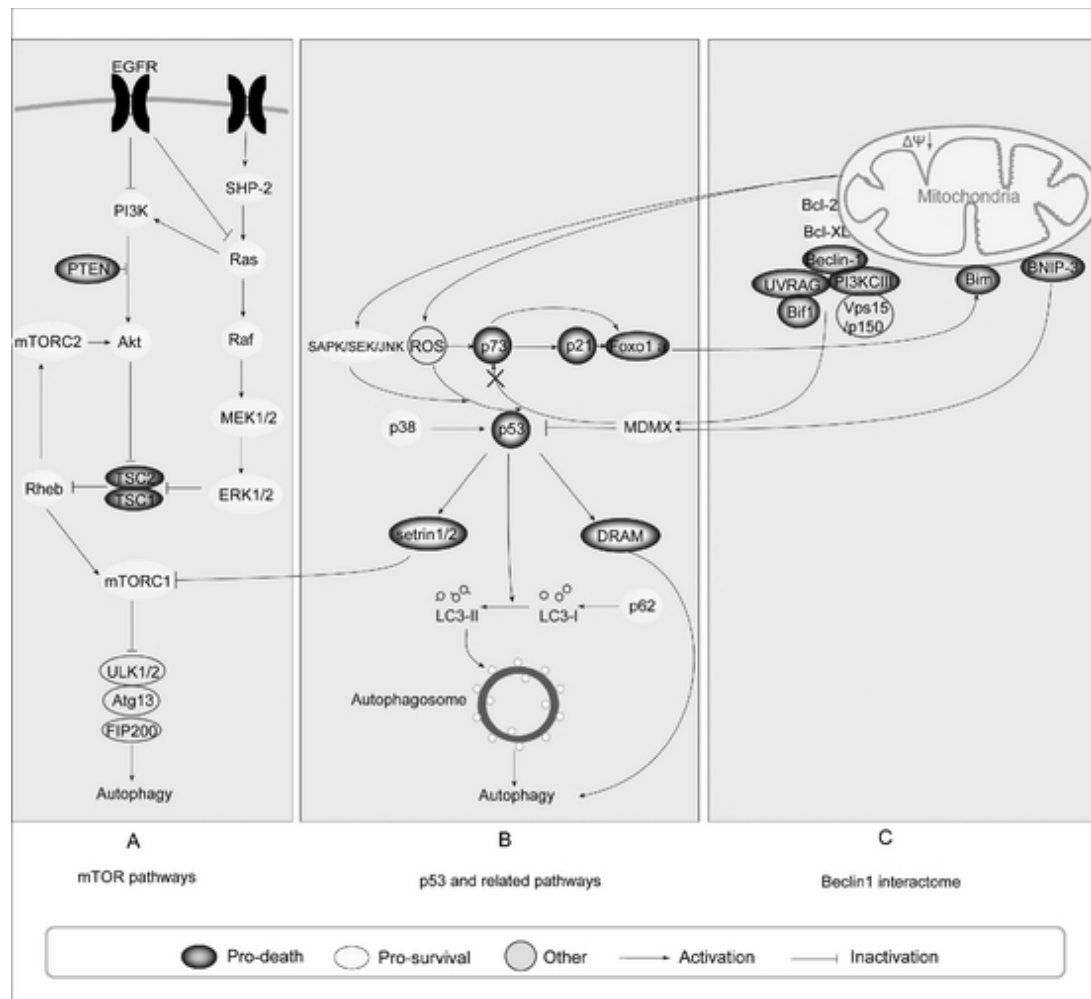
autofagia ha sido descrita como un mecanismo de supervivencia de la célula tumoral y por tanto como una posible diana terapéutica cuya inhibición induciría la muerte de la célula tumoral.⁵¹

Distintas vías metabólicas pueden activar mecanismos de autofagia, como la vía mTORC1/C2, p53 o Beclin 1 (Figura 4).⁵² En mamíferos, dos proteínas homólogas de Atg1 (ULK1 y ULK2), junto con Atg13 y la proteína FIP200, son capaces de formar un complejo capaz que constituir el pre-autofagosoma.⁵³ Bajo ciertas condiciones nutricionales, Atg13 es hiperfosforilada por mTORC1, perdiendo ésta su capacidad de unión a ULK e inhibiéndose por tanto el proceso de autofagia.⁵⁴

El papel de p53 en la autofagia es complicado y variable ya que mientras que su presencia en el citoplasma puede inhibir mecanismos de autofagia, en el núcleo, p53 induce la transcripción de DRAM (Damage-Regulated Autophagy Modulator) y sestrin 1 / 2, favoreciendo la activación de la autofagia. DRAM es un gen que codifica una proteína lisosomal que induce macro-autofagia y que es un efector de muerte mediada por p53, por ejemplo en respuesta a daño sobre el ADN.^{55,56} Sertrin 1 / 2 también son inducidas por p53 y son reguladores negativos de mTORC1.

Otra proteína importante en la autofagia es Beclin 1. Diversos estudios sugieren que Beclin 1 coordina mecanismos de autofagia implicados en muchos procesos fisiológicos y patológicos,⁵⁷ participando junto con PI3KC3 de la formación de la estructura pre-autofagosómica.⁴⁷

Figura 4. Vías metabólicas implicadas en la muerte celular por autofagia



L.Ouyang. Cell Proliferation, 2012

3.2 CICLO CELULAR

La capacidad de proliferación de una célula viene determinada por las características de su ciclo celular, que ejecuta de forma ordenada una serie de procesos que culminarán con la división de la célula. El ciclo celular se divide en varias fases. En la interfase, que se divide en 3 subfases (G_1 , S y G_2) la célula crece y duplica su material genético. En G_1 se sintetizan las proteínas necesarias para la progresión a fase S (“síntesis”), en la que se produce la replicación del material genético. La fase G_2 , precede a la fase de mitosis o fase M, en la que tiene lugar la división nuclear y citoplasmática.

A lo largo del ciclo existen puntos de control o *checkpoints* que supervisan momentos críticos del ciclo celular, como son el tamaño de las células, la replicación del ADN, la segregación de los cromosomas y la presencia de lesiones en el ADN. Los puntos de control que responden a señales externas actúan principalmente en G₁. En esta fase se ha definido un periodo de tiempo, denominado en mamíferos punto R o de restricción, en el cual la célula comprueba que ha generado la masa necesaria para seguir adelante y comenzar la síntesis de ADN. La superación de este punto conduce a las células a la progresión del ciclo celular, volviéndose refractarias a la acción de señales extracelulares. Al final de la fase G₂ existe el punto de control G₂/M, en el que la célula comprueba que ha duplicado su masa y que ha duplicado su ADN únicamente una vez. Superado este punto la célula está preparada para entrar en mitosis. En esta fase, el punto de control M asegura una correcta organización del huso mitótico. Así, los *checkpoints* o puntos de control de daño en el ADN actúan en tres fases del ciclo celular: en la transición G₁/S, en el control de la progresión a través de la fase S, y en la transición G₂/M, asegurando que una célula con daño en el ADN o una incorrecta replicación no progrese a través del ciclo.⁵⁸⁻⁶¹

3.2.1 REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

Las principales proteínas reguladoras del ciclo celular son:

- Ciclinas (CCN)
- Quinasas dependientes de ciclinas (CDKs. Cyclin-Dependente kinases)
- Complejos ciclina-CDKs
- Inhibidores de CDKs
- p53

Las **CCN** y las **CDKs** forman complejos regulados por múltiples vías y son los encargados de activar el ciclo celular. Las **ciclinas** (Figura 5) se agrupan según el momento del ciclo en el que actúan. Son proteínas de vida muy corta que tras disociarse de sus quinasas asociadas, se degradan con extrema rapidez. Sus niveles se regulan por sus tasas de síntesis y de destrucción y van variando a lo largo del ciclo celular.

Figura 5. Expresión diferencial de ciclinas durante las distintas fases del ciclo

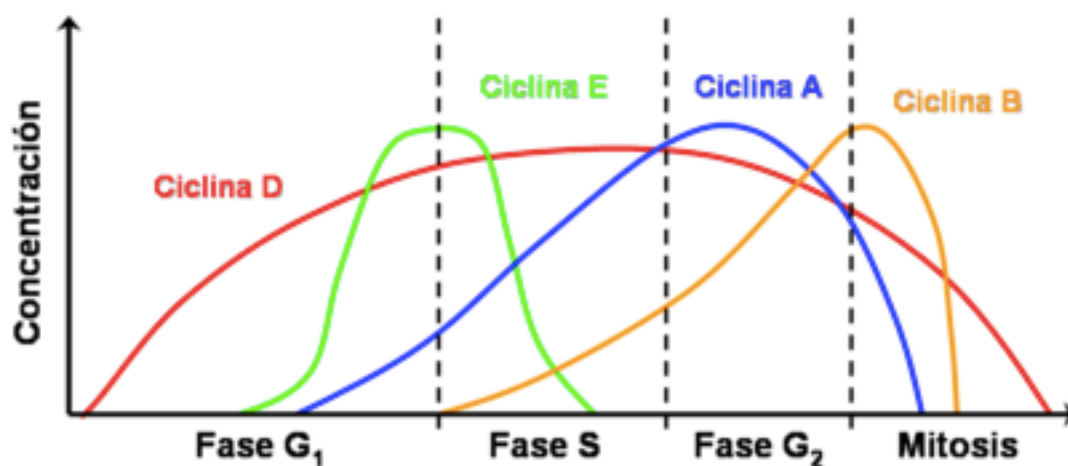
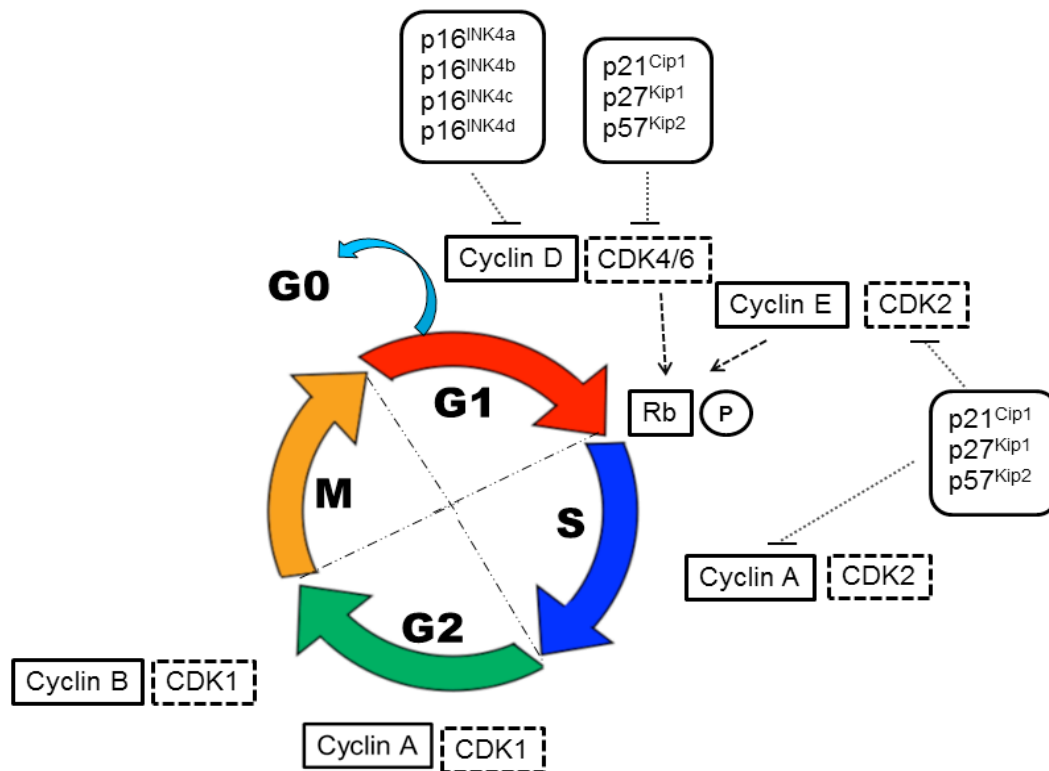


Imagen modificada del libro "Control of the cell cycle: Figure 2," del OpenStax College, Biology (CC BY 3.0).

Las **CDKs** se caracterizan por necesitar la unión de la ciclina para ser activas. Cada CDK se asocia a una o varias ciclinas de forma específica y realiza su función en un punto concreto del ciclo celular.^{62,63} Los **complejos CDK-ciclina** (Figura 6) son necesarios para la transición entre las distintas fases del ciclo celular, fosforilando distintos sustratos en las diferentes fases del ciclo, como la proteína del gen Rb que cuando está hipofosforilada, inhibe la progresión del ciclo celular de fase G₁ a S.⁶⁴

Figura 6 Complejos de ciclinas y CDKs a lo largo del ciclo celular



D. Lombardi y L. Lasagni del libro "Cell Biology - New Insights", 2016

Los **Inhibidores de CDKs** pueden pertenecer a distintas familias:

- **Familia KIP.** Los componentes de esta familia son p21, p27 y p57, capaces de inhibir todos los complejos CDK-ciclina de la fase G₁ y S. En particular p21 protege a las células de la apoptosis parando el ciclo celular e induciendo la reparación del ADN dañado, y puede ser activado por vías dependientes e independientes de p53.⁶⁵ Por otro lado, p27 interactúa con distintos complejos CDK-ciclina, siendo el complejo CDK2-ciclina E su principal diana.⁶⁶
- **Familia INK4.** La familia INK4 está formada por p16, p15, p18 y p19. Son inhibidores específicos de CDK4 y CDK6 y su mecanismo de acción consiste en competir con las ciclinas D por la unión a las CDKs.⁶⁷
- **Gen supresor p53.** Es el gen supresor de tumores mejor conocido y más estudiado en los últimos años y codifica la proteína homónima

que tiene múltiples funciones y puede actuar a través de vías dependientes o independientes de la transcripción. Aunque no es esencial para la progresión del ciclo, puede regular de forma negativa la proliferación celular a través de dos mecanismos: el bloqueo del ciclo celular y la apoptosis.⁶⁸ p53 está involucrada en los puntos de control o *checkpoints* de respuesta al daño en el ADN. Su nivel es bajo en células normales, pero se produce un incremento en respuesta a lesiones en el ADN, y la proteína activará la expresión de genes que mediarán la supresión del crecimiento, como p21, GADD45 (*DNA Damage-Inducible Gene-GADD45*) y 14-3-3 σ . p53 también activa la expresión de otros genes como MDM-2 (*Mouse Double Minute-2*), un oncogén que a su vez regula negativamente la transcripción de p53 y marca a la proteína para su degradación. Entre los diferentes genes modulados por la acción de p53 encontramos también genes implicados en la apoptosis como Bcl-2 (*B-Cell CLL/Lymphoma-2*) y Bax (*Bcl2 Associated-X Protein*).⁶⁹⁻⁷³

Se estima que las mutaciones de p53 son el suceso genético más frecuente en los tumores humanos, ocurriendo en más del 50% de los casos. Sin embargo en el MM, la mutación del gen p53 es un evento raro al diagnóstico; aunque la incidencia se incrementa en estadios avanzados de la enfermedad, lo que sugiere que juega un papel esencial en la progresión. Alrededor de un 3% de los pacientes de nuevo diagnóstico tiene mutaciones de p53 (porcentaje similar al observado por las nuevas técnicas de secuenciación), correlacionándose este evento con supervivencias menores.⁷⁴⁻⁷⁸ En concordancia, la delección de p53, presente en el 10-15% de casos al diagnóstico, se ha relacionado con mal pronóstico en esta enfermedad.⁷⁹⁻⁸²

En el caso de la LLC, esta delección se encuentra en el 5-7% de casos en estadios tempranos de la enfermedad, mientras que en estadios avanzados y refractarios se encuentra hasta en un 25-40%.⁸³ Además, la presencia de mutaciones de p53, también relevantes en el pronóstico de esta enfermedad, no siempre

concuerdan con las deleciones de p53. La incidencia de mutaciones en pacientes no tratados es aproximadamente de un 10%, mientras que porcentajes más elevados se encuentran en pacientes con LLC refractarios a fludarabina.^{83,84}

Las alteraciones de p53 en LMA *de novo* suelen ser por deleción de un alelo (bien por translocación o bien por deleción de 17p) y mutación del otro alelo. Sin embargo, la activación de p53 en pacientes con LMA se ha definido clásicamente como un hecho raro, siendo más frecuente en LMA secundarias a tratamiento quimioterápico y en pacientes con cariotipos complejos, pero de cualquier manera asociado con mal pronóstico^{85,86}

3.3 DAÑO Y REPARACIÓN DEL ADN

El genoma está sujeto a varios tipos de daño: por agentes exógenos (por ej. radiación o citotóxicos) o endógenos (ej. radicales libres o recombinación). La capacidad de reparar el daño del ADN es vital para mantener la integridad del genoma, y, por tanto, la viabilidad celular. De esta forma, las células presentan mecanismos altamente conservados, llamados en su conjunto: respuesta de daño sobre el ADN (*DNA-damage response*, DDR), para detectar las lesiones del genoma, señalizarlas y proceder a su reparación. Aunque las respuestas difieren para distintos tipos de daño, siguen un patrón general, en el que múltiples procesos actúan de forma cooperativa y comparten efectores.

3.3.1 CONDICIONES Y AGENTES INDUCTORES DE DAÑO SOBRE EL ADN

- Condiciones metabólicas normales.
- Ciertas radiaciones: radiaciones ionizantes (radiación-X, rayos gamma, etc.); radiación UV (UV-C, UV-B...).
- Radicales libres (especies reactivas de oxígeno) con electrones desapareados muy reactivos, que producen normalmente oxidaciones.

- Sustancias químicas como agentes quimioterápicos (alquilantes, análogos de metabolitos, inhibidores de topoisomerasa II), humo del tabaco, aflatoxinas de los hongos.

3.3.2 TIPOS DE LESIONES SOBRE EL ADN

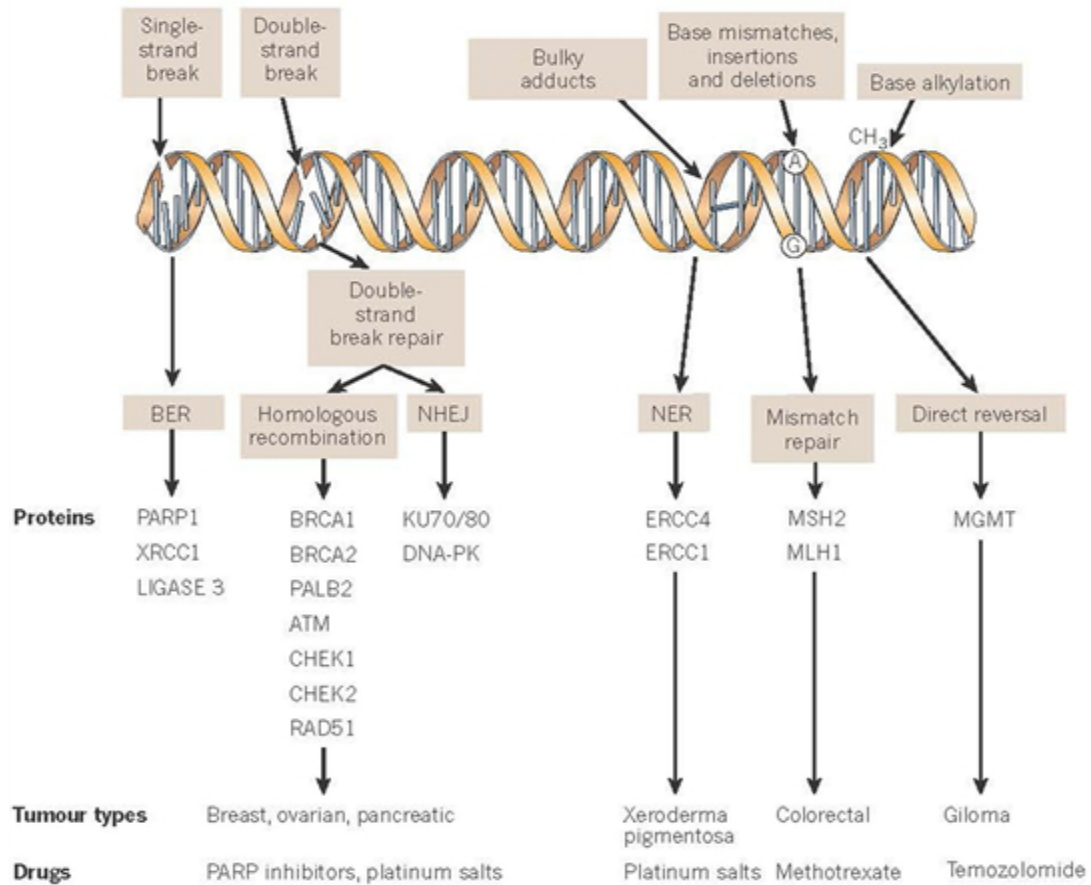
- **Modificaciones químicas de las bases (A,C,T,G)** como desaminaciones, metilaciones, oxidaciones, alquilaciones (unión de grupos alquilo a las bases del ADN producidas por agentes como la bendamustina o melfalán); pérdida de bases, sobre todo de purinas (A y T) y cambio en la siguiente replicación de la base original por una base modificada.
- **Mal apareamiento** de bases durante la replicación.
- **Uniones covalentes entre bases** (*cross links*) producidas por agentes como el cisplatino, carboplatino, oxiplatino y mitomicina C.
- **Rotura de hebras:** rotura de una de las hebras (*single strand break*, SSB), rotura de las dos hebras (*double strand break*, DSB). Las roturas de la hebra de ADN son las formas más citotóxicas de daño al ADN. Las roturas son generadas de forma natural cuando las horquillas de replicación se encuentran con lesiones que bloquean su avance y provocan su colapso, como ocurre, por ejemplo, con el daño por radicales libres de oxígeno, y también se pueden inducir cuando las células son expuestas a agentes que dañan el ADN. Las lesiones de agentes alquilantes y de fármacos que inhiben la topoisomerasa, bloquean el avance de las horquillas de replicación impidiendo la reparación del daño. La incapacidad de reparar estos daños puede provocar muerte celular o cambios a gran escala en los cromosomas (deleciones, translocaciones, fusiones...) e inestabilidad genómica.

3.3.3 MECANISMOS DE REPARACIÓN DE DAÑO SOBRE EL ADN

Dado que existe diversas formas en las que se puede producir daño al ADN, existen múltiples mecanismos de reparación. El estudio de la secuencia exacta de la reparación del daño al ADN es difícil, dado que muchos eventos tienen escasa separación temporal u ocurren simultáneamente. En la Figura 7 se muestra un esquema de

los principales mecanismos de reparación de daño y las proteínas implicadas en cada vía, que además se explican resumidamente a continuación.

Figura 7. Mecanismos de daño y reparación del ADN



Lord and Ashworth, Nature 2012

- **Reparación por excisión de bases (*Base excision repair, BER*).** Es capaz de reparar el daño por oxidación, alquilación o desaminación de una única base. La enzima ADN glicosilasa glicosila la base dañada, una endonucleasa y fosfodiesterasa la reconocen, la cortan y la eliminan. La ADN polimerasa resintetiza el nucleótido que falta. Finalmente una ADN ligasa mantiene la continuidad de la cadena.⁸⁷
- **Reversión directa (*Direct reversion*).** Repara las metilaciones. Los agentes alquilantes modifican la guanina a metilguanina y producen un apareamiento incorrecto en la replicación introduciendo una timina con la metilguanina, y en la siguiente replicación una adenina en sustitución de la primera guanina modificada. Para la reparación existe una enzima, la metilguanina ADN-metiltransferasa que retira el grupo metilo de la metilguanina y después se disocia del ADN. La unión de la enzima con el grupo metilo es irreversible, por lo que tras la disociación del ADN se ubiquitina para su degradación en el proteosoma.
- **Reparación por excisión de nucleóticos (*Nucleotide excision repair, NER*).** Este mecanismo se usa para alteraciones más grandes, que cambian la configuración molecular, reconociéndose el daño al ADN porque distorsiona la arquitectura de la doble hélice. Este mecanismo se desdobra en dos distintos según el método para reconocer la lesión, bien sea acoplado o no a la transcripción. En la reparación por NER, la lesión es reconocida por nucleasas que se unen a los extremos 3' y 5', a continuación se unen al complejo ADN helicasas que destruyen el fragmento alterado, para que luego las ADN polimerasas lo sustituyan por un fragmento monocatenario de 22-30 pares de bases acoplándose con las ADN ligasas.⁸⁸
- ***Mismatch repair (MMR)*.** Corrige los errores que se producen en la replicación y recombinación debido a la no complementariedad de bases, por lo que se produce una eliminación del nucleótido por acción de una exonucleasa que corta y elimina el fragmento dañado. Se insertan los nucleótidos correctos con una ADN polimerasa y se acoplan mediante una ligasa.⁸⁹

- **Reparación de roturas de doble hebra.** Las células eucariotas reparan las roturas de doble hebra por medio de dos mecanismos principales: recombinación no homóloga (*non-homologous end joining*, NHEJ) y recombinación homóloga (*homologous recombination*, HR),⁹⁰ dependiendo del tipo de daño y de las características de la célula implicada.⁹¹
 - **Reparación no homóloga (NHEJ).** El mecanismo de reparación NHEJ puede actuar en cualquier fase del ciclo celular. Clásicamente se ha descrito como un mecanismo tendente al error, ya que aunque hasta el 50% de las DSBs pueden ser reparadas por NHEJ de forma precisa, una parte importante conllevará la delección de varios pares de bases que pueden en algunos casos ser importantes (ADN codificante) o carecer de repercusión biológica (ADN no codificante). En este mecanismo, las roturas de doble hebra son reconocidas por la proteína Ku, que se une y activa a la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de DNA (DNA-PKcs), que van a digerir los extremos y reclutar a la ADN polimerasa y ADN ligasa IV encargadas de solucionar la rotura fusionando los extremos.⁹²
 - **Recombinación homóloga (HR).** La recombinación homóloga se considera más precisa, ya que se usan secuencias homólogas en otro lugar del genoma (cromátida hermana, regiones homólogas en el mismo u otro cromosoma) como molde para la reparación, por lo que sólo puede actuar en fase de síntesis y G₂. De esta forma, si la “plantilla” es perfectamente homóloga, la reparación puede ser totalmente precisa. En este proceso hay múltiples proteínas y complejos proteicos implicados, con varias vías posibles. De forma general la recombinación homóloga se inicia con la generación de un ADN monocatenario. La formación de este ADN monocatenario está iniciada por la actividad del complejo MRN, compuesto por las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1, que son fundamentales en la fase precoz de señalización del daño. Sus funciones incluyen,

además de la reparación de roturas de doble hebra del ADN, el mantenimiento de los telómeros y durante la replicación la resolución de horquillas y estructuras estancadas.^{93,94} A través de MRE11, el complejo se une a los extremos libres de la hebra del ADN, y, mediante enlaces de Zn^{2+} e interacciones Rad50-Rad50 forma puentes entre los fragmentos del cromosoma. A través de NBS1, se recluta ATM en su forma inactiva. ATM y ATR son dos proteínas clave en la señalización de las roturas de doble hebra que son reclutadas y activadas en los focos de rotura. En esa situación, actúan sobre unas 700 proteínas distintas, principalmente implicadas en reparación del daño al ADN y muy interconectadas entre sí.⁹⁵ Además del efecto directo sobre otras proteínas, las señales inducidas por ATM y ATR promueven la expresión y activación de otras proteínas implicadas en la reparación del ADN, modulando cambios como fosforilación, acetilación, ubiquitinación o sumoilación. Dos de las proteínas activadas por ATM y ATR mejor estudiadas son CHK1 y CHK2 (*checkpoint kinase 1 y 2*). CHK1 y CHK2, junto con ATM y ATR ejercen un efecto de parada del ciclo celular al actuar sobre distintas las CDKs por vías dependientes e independientes de p53.⁹⁶ La forma activa de ATM también fosforila a la histona 2AX (pH2AX) en respuesta a roturas de doble hebra modificando la estructura de la cromatina. La proteína pH2AX es fundamental en la señalización precoz de este tipo de roturas y se puede observar a lo largo de regiones que ocupan megabases en torno a los focos de rotura. Además pH2AX co-localiza con otras proteínas implicadas en la reparación del ADN como RAD 51, ATM, BRCA1 y el complejo MRN.

Si los mecanismos de reparación previamente expuestos desencadenan una reparación exitosa, la célula podrá mantener sus funciones normales y sobrevivir; en cambio, si el daño no puede ser

reparado y se cronifica, la célula puede entrar en senescencia, en apoptosis o adquirir mutaciones que modifiquen su ciclo celular haciéndola incluso resistente a la apoptosis e inmortal.

Algunos de los fármacos estudiados en esta Tesis son agentes que inducen daño sobre el ADN, mientras que otros fármacos son capaces de inhibir la reparación del daño.

3.4 EPIGENÉTICA

La configuración en la que se produce el “empaquetamiento” de la cromatina constituye un aspecto fundamental de la biología celular, afectando a funciones como el control transcripcional, estabilidad cromosómica, reparación y replicación de ADN.⁹⁷ La interacción entre el ADN y la cromatina con sus modificaciones codifica información que puede ser preservada durante la división celular. Existen tres mecanismos epigenéticos fundamentales: la metilación del ADN, la modificación de histonas y el ARN no codificante (Figura 8).

3.4.1 METILACIÓN DEL ADN

Las DNA metiltransferasas catalizan la adición de un grupo metilo a la posición 5´ del anillo de citosina de las secuencias CpG, regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos, y que están localizadas principalmente en la región 5´ (promotor) de los genes (islas CpG). La metilación del ADN es el proceso epigenético más frecuentemente observado y posiblemente más estudiado en cáncer. Actúa modificando la expresión génica y por ende la función de genes constitutivos, incluyendo oncogenes y genes supresores de tumores. Un gran número de estudios han demostrado una correlación inversa entre la metilación de las islas CpG y la expresión génica, principalmente en neoplasias hematológicas y en particular en síndromes mielodisplásicos (SMD) y LMA⁹⁸ pero también en MM¹⁰³ y LLC.^{99,100}

3.4.2 MODIFICACIONES DE HISTONAS

Las ocho histonas (dos moléculas de cada clase: H2A, H2B, H3 y H4) junto con aproximadamente 147 pares de bases del ADN alrededor de cada

octámero de histonas forman el nucleosoma, que es la unidad estructural de la cromatina. El extremo N-terminal de las histonas está sujeto a cambios covalentes, entre los que se encuentra la acetilación, metilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, sumoilación de lisinas, metilación de argininas y fosforilación de serinas y treoninas. Las modificaciones covalentes, salvo la metilación, cambian la carga eléctrica de la proteína, reduciendo la afinidad de las interacciones inter-nucleosómicas o entre el ADN y las histonas. La acetilación de las histonas H3 y H4 por las acetil transferasas de histonas (HAT, *histone acetyltransferase*) promueve la transcripción, mientras que la acción de las deacetilasas de histonas (HDAC, *histone deacetylase*) promueve la formación de heterocromatina, inhibiendo la transcripción.¹⁰¹

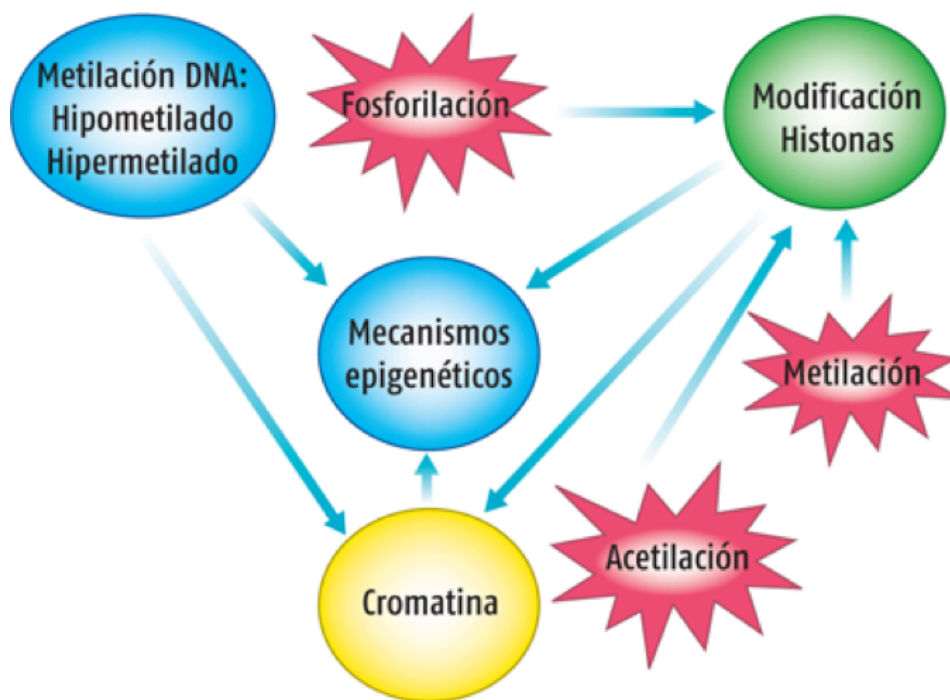
El silenciamiento genético por hiperacetilación se ha relacionado con un peor pronóstico en diversas enfermedades neoplásicas, tanto sólidas como hematológicas,¹⁰² por lo que las HDAC se han convertido en una diana terapéutica utilizada en diferentes neoplasias hematológicas.¹⁰³ Además, las HDAC se han relacionado con otras funciones. En concreto la HDAC8 ha sido relacionada recientemente con la reparación de daño por HR en MM. Además de demostrarse el reclutamiento de la HDAC8 a los puntos de daño (DSBs) junto a RAD51 tras irradiar líneas celulares de MM, también se ha visto que la inhibición de la HDAC8 disminuye la actividad y los niveles de RAD51,¹⁰⁴ y por tanto disminuye la eficiencia reparadora de daño por HR. Por otro lado, la inhibición de la HDAC6¹⁰⁵ en MM se ha relacionado con la inhibición del agrosoma,¹⁰⁶ y con el consecuente acúmulo de proteínas mal plegadas que conllevaría la muerte celular. Este mecanismo de muerte se potencia sobre todo cuando se combina con la inhibición simultánea del proteasoma,¹⁰⁷ siendo así máximo el acúmulo de proteínas mal plegadas.

3.4.3 MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR ARN NO CODIFICANTE

Esta regulación de la expresión génica se debe principalmente al silenciamiento post-transcripcional mediante oligonucleótidos anti-sentido contra el producto que se pretende inhibir. Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de ARN específicas de regiones no traducidas en el extremo 3' de los genes, de forma que producen una reducción específica de

su producto (bien por degradación del ARN mensajero o por inhibición de su traducción). La función de los microRNAs se ha comenzado a estudiar durante la última década y se ha revelado de vital importancia tanto en el funcionamiento de la hematopoyesis normal como en su implicación en el desarrollo de neoplasias hematológicas, donde este ARN no codificante podría tanto servir como biomarcador o en muchos casos como diana terapéutica.¹⁰⁸

Figura 8. Codificación de la información epigenética



*P. F. Valencia Mayoral y J. Áncer Rodríguez, Patología,
www.accesmedicina.com*

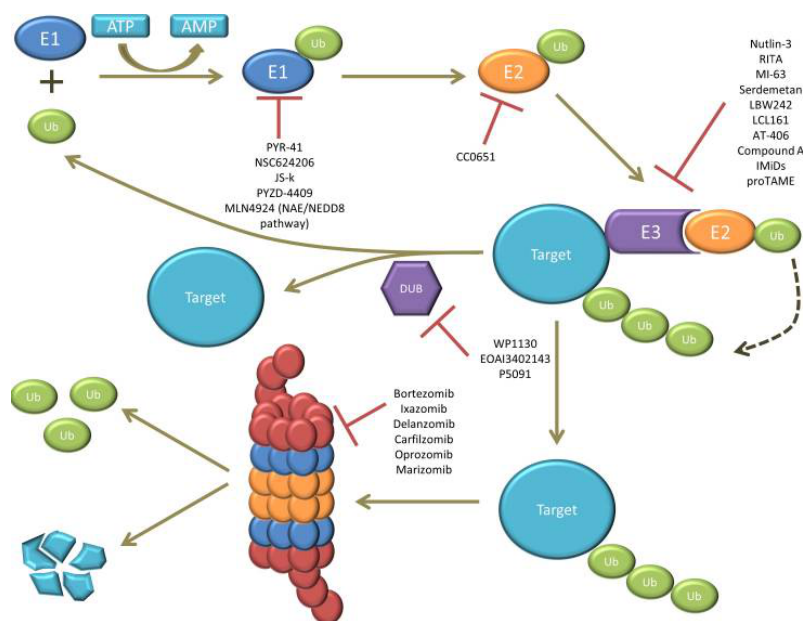
3.5 VÍA UBIQUITINA-PROTEASOMA

Inicialmente se pensaba que los proteasomas y el sistema ubiquitina-proteasoma sólo actuaban sobre proteínas dañadas, pero hoy sabemos que también degradan de forma fisiológica proteínas del ciclo, proliferación y diferenciación celular. Así el sistema ubiquitina-proteasoma (Figura 9) es uno de los medios que emplea la célula para regular la función de las proteínas, limitando su vida media y controlando su concentración, lo que mantiene un equilibrio entre síntesis y degradación. Los proteasomas son grandes

complejos proteolíticos de enzimas cuya misión es la degradación de proteínas. Para que una proteína sea reconocida y procesada en el proteasoma es necesario que se encuentre “ubiquitinada”, es decir, marcada con la proteína ubiquitina. El proceso de ubiquitinación de una proteína requiere la participación de tres tipos de enzimas: la enzima activadora de ubiquitina, E1; la enzima conjugadora de ubiquitina, E2; y la ubiquitina ligasa E3.^{161;162}

La inhibición del proteasoma produce la acumulación intracelular de proteínas, lo que resulta tóxico para las células. El bortezomib fue el primer fármaco diseñado específicamente con esta función y ha resultado especialmente eficaz en el MM. Otros fármacos como ixazomib (MLN9708) o carfilzomib (Figura 9), son inhibidores del proteasoma de segunda generación desarrollados posteriormente. Entre los mecanismos de acción de los inhibidores del proteasoma se incluyen, el bloqueo en la activación de la vía NF-κB, la inducción de apoptosis, infra-expresión de moléculas de adhesión, inhibición de los efectores implicados en los mecanismos de reparación del ADN e inhibición de angiogénesis.¹⁰⁹

Figura 9. Vía ubiquitina-proteasoma.



S. Lub. Oncotarget 2015

3.6 VÍA NF-κB

En resumen, y atendiendo a la parte de la vía que se relaciona con el presente trabajo de investigación, diremos que el factor nuclear NF-κB puede activarse en respuesta a daño sobre el ADN, traslocándose al núcleo e induciendo la transcripción de genes anti-apoptóticos que favorecerían la proliferación celular. La proteína IκB es un inhibidor natural de NF-κB, que forma un complejo con NF-κB en el citoplasma impidiendo su activación y traslocación al núcleo. IκB es una proteína regulada por el proteasoma, de forma que cuando se fosforila se ubiquitina y es degradada por éste, liberándose NF-κB que pasaría al núcleo, favoreciéndose así la expansión del clon tumoral. Por ello, una de las funciones clave de los inhibidores del proteasoma es la regulación de la actividad de IκB (*Inhibitor of kappa B*), inhibiendo su degradación, y por tanto, inhibiendo la translocación de NF-κB al núcleo.¹¹⁰

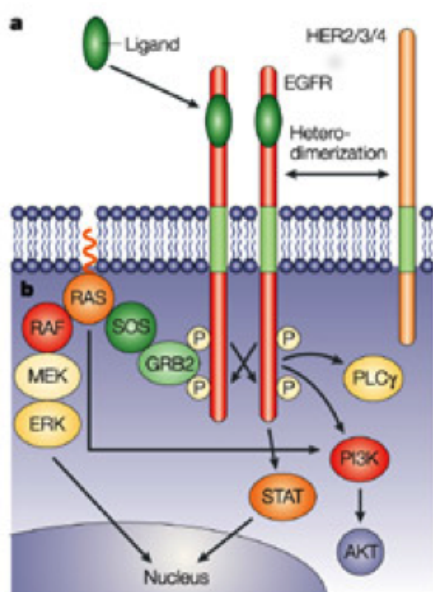
3.7 RECEPTORES TIROSINA QUINASA

Los receptores tirosina-quinasa tienen una gran importancia fisiológica mediando funciones vitales para la célula como la regulación de la proliferación, diferenciación, supervivencia y modulación del metabolismo celular. Son moléculas de membrana con 3 dominios principales: extracelular, transmembrana e intracelular (Figura 10). El dominio intracelular o citosólico posee actividad tirosina quinasa, y su activación pone en marcha una vía de transducción de señales que incluye la proteína RAS, asociada a las proteínas MAPK o a la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). Su activación mediante un estímulo externo provoca una cascada interna de reacciones enzimáticas que facilita, en situaciones fisiológicas, la adaptación de la célula a su entorno por mediación de mensajeros secundarios. Decenas de moléculas de señalización funcionan con este tipo de receptores, entre ellas factores de crecimiento y citocinas (por ejemplo: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF),

factor de crecimiento epidérmico (EGF)) y algunas hormonas importantes (eritropoyetina, insulina, hormona de crecimiento).¹¹¹

En ausencia de ligando estos receptores se encuentran normalmente inactivos, excepto en determinadas patologías como algunos tipos de cáncer, donde estos receptores están frecuentemente sobre expresados y/o constitutivamente activados, siendo su activación una pieza clave en la proliferación celular descontrolada y tratándose por tanto de una muy buena diana terapéutica. El principal exponente de los fármacos dirigidos contra esta diana es imatinib, que al inhibir la actividad tirosina quinasa de la proteína de fusión BCR/ABL, esencial en el desarrollo de la leucemia mieloide crónica (LMC), ha cambiado radicalmente el pronóstico y el tratamiento de esta enfermedad.¹¹² Desde entonces diversas drogas han sido diseñadas para bloquear el efecto proliferativo y anti-apoptótico de estos receptores, como es el caso de nilotinib o dasatinib. Estos inhibidores han demostrado actividad en LMC, leucemia linfoblástica aguda (LLA) y también en MM.⁸ Otros inhibidores como el midostaurin han demostrado eficacia en LMA inhibiendo el receptor tirosina-quinasa FLT3, constitutivamente activado en algunas LMA.¹¹³

Figura 10. Receptores tirosina quinasa y transducción de señales



Gschwind, A. Nature Reviews, 2012

3.8 VÍA RAS/ RAF/ MEK/ ERK

La vía de Ras/Raf/MEK/ERK se activa en respuesta a muchos factores de crecimiento y citocinas que inducen proliferación celular y previenen la apoptosis en las células hemopoyéticas. Tras unirse el ligando al receptor, Shc (proteína adaptadora de señalización) se une con el extremo carboxi-terminal del receptor transmembrana y recluta a Grb2/Sos (*GTP-exchange complex growth factor receptor bound-2/son of sevenless exchange*), lo que provoca que Ras unido a la membrana se una a GTP. Ras-GTP recluta a Raf (MAPKKK) que se activa iniciando así la cascada de señalización. Raf es una familia de genes que codifica para RAF1, ARAF y BRAF (Figura 10).¹¹⁴ Las quinasas Raf son necesarias para la fosforilación de MEK (*Mitogen associated / extracellular regulated kinase-1*; MAPKK) y MEK a su vez fosforila a ERK1 y ERK2 (*extracellular regulated kinases 1/2*; MAPK) en residuos específicos. Las quinasas de serina ERK1 y ERK2 fosforilan y activan a una variedad de sustratos, entre los que se incluyen Elk1 y Fos, que están implicados en proliferación y supervivencia. La activación de Ras/ Raf/ MEK/ Erk también modula la expresión de proteínas implicadas en apoptosis/supervivencia como Bcl-2, Bad, Bim, Mcl-1, caspasa 9 y survivina. Las mutaciones que provocan la activación constitutiva de Ras ocurren hasta en un 30% de los cánceres,¹¹⁵ por lo que Ras es considerada una importante diana terapéutica que continua en investigación.¹¹⁶ La activación de la vía de Ras requiere la localización en la membrana celular de Ras, lo que implica una modificación lipídica mediada por la enzima FT (*farnesyl transferase*) y GT (*geranylgeranyl transferase*). Por tanto el uso de drogas para inhibir la “farnesilación” de Ras puede ser una buena aproximación en el tratamiento de tumores con Ras mutado.¹¹⁷

3.9 VÍA PI3K/ AKT/ mTOR

Esta vía es necesaria en la proliferación, crecimiento y diferenciación de las células tumorales así como de las células *stem*. En concreto, la vía

fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) se ha relacionado con funciones celulares como el crecimiento celular, proliferación, movilidad, supervivencia y tráfico intracelular (Figura 11).¹¹⁸ Por otro lado dentro de las 3 clases de PI3K, la clase IA se encuentra mutada en varios tipos de cáncer, lo que provoca que la quinasa se encuentre más activa de lo normal. Además, esta vía está regulada negativamente por proteínas como la enzima PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*), proteína también ausente en muchos tipos de tumores. Por ello se ha sugerido que la fosfatidilinositol-3-quinasa constituye una vía oncogénica activa en cáncer siendo objeto de estudio como diana terapéutica.¹¹⁹

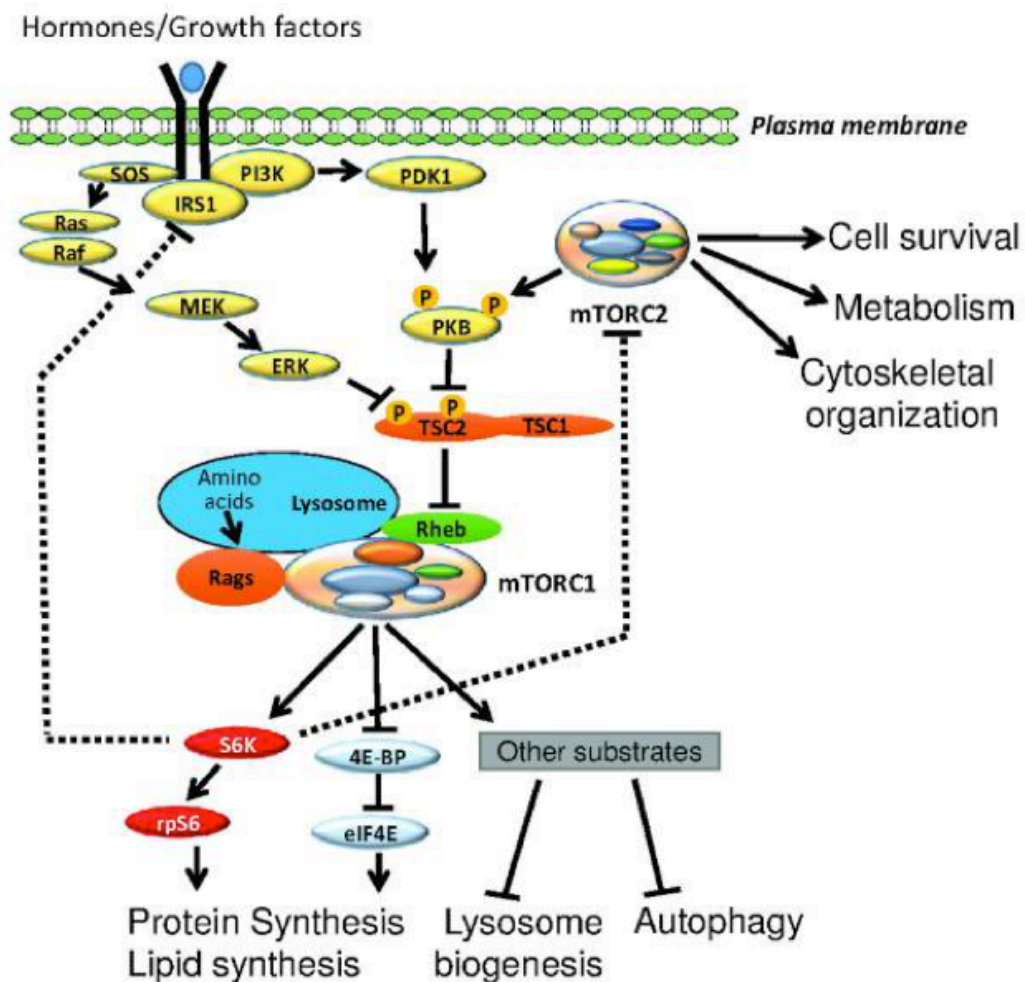
La proteína Akt (o proteína quinasa B, PKB) tiene tres isoformas conocidas (Akt-1, Akt-2, Akt-3) que son fosforiladas por la proteína PDK1, dando lugar a su activación. Una vez activada Akt se localiza tanto en el núcleo como en el citosol, teniendo efectos anti-apoptóticos cuando su localización es nuclear. Akt fosforila a muchas proteínas, por lo que es un regulador fundamental para la célula. Cabe destacar que Akt fosforila a I κ B, que es así marcado para la degradación por el proteasoma, dejando entonces de inhibir a NF- κ B que pasaría al núcleo. Akt puede también inhibir a CREB que regula la expresión de genes anti-apoptóticos como Mcl-1 y Bcl-2.¹²⁰

Fármacos como la perifosina,¹²¹ han sido estudiados como inhibidores de esta vía presentando actividad *in vitro* e *in vivo* en algunas neoplasias hematológicas como el MM.¹²²

Otra proteína importante en esta vía es mTOR (Figura 11).¹²³ La proteína mTOR es un regulador del metabolismo celular en mamíferos, con un papel importante en la función de tejidos como el hígado, músculo, tejido graso y cerebro; y que está desregulado en enfermedades como la diabetes, la obesidad, la depresión y algunos cánceres.¹²⁴ Esta proteína fue descubierta mientras se investigaban las propiedades anti-proliferativas y anti-fúngicas de la rapamicina o sirolimus, un macrólido producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. Algunos años después se detectaron sus propiedades inmunosupresoras iniciándose su uso en la prevención del rechazo en el trasplante renal. A raíz de estas investigaciones en 1990 se

identificaron las proteínas TOR1 y TOR2 en levaduras, como mediadores de los efectos citotóxicos de la rapamicina. Posteriormente se pudo confirmar que la rapamicina y sus análogos (temsirolimus, everolimus) solo eran capaces de regular al complejo mTORC1.¹²⁵ Desde entonces han aparecido inhibidores de mTOR de segunda generación que ya inhiben ambas ramas de la vía (mTORC1 y mTORC2).¹²⁶

Figura 11. Vía PI3K/ Akt mTOR



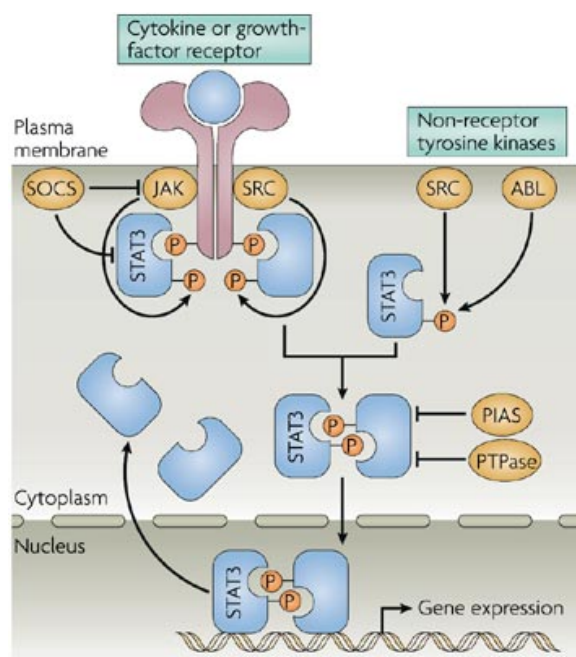
Jianling X. Biomed Res Int. 2017

3.10 VÍA JAK / STAT

La vía JAK/STAT (Figura 12) fue descubierta a través del estudio de la transducción de señales intracelulares inducidas por interferón. Desde entonces se han encontrado diversas citocinas, hormonas y factores de crecimiento que activan esta vía. La vía está formada por tres familias de proteínas: JAK (*Janus kinases*), STAT (*signal transducers and activators of transcription*) y SOCS/CIS (*supresor of cytokine signalling/ cytokine inducing SH2-containing*) esta última para disminuir la actividad de JAK/STAT. En mamíferos se conocen 4 miembros de la familia JAK (JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2) y siete factores STAT (STAT1-STAT6).¹²⁷

La vía JAK/STAT se activa por la unión de ligando (citocinas, interferón, factores de crecimiento) a los receptores de membrana y la inducción de la heterodimerización de éstos. Entonces se produce la fosforilación y activación de las proteínas JAK asociadas al receptor, que una vez activadas son capaces de fosforilar en residuos tirosina a las cadenas del receptor, creando sitios de unión para los dominios homólogos a SRC (por ejemplo, los dominios SH2 de proteínas STAT como STAT3). Las STATs son reclutadas por el receptor fosforilado, para que a su vez sean fosforiladas por las proteínas JAK. Las proteínas STAT después de ser fosforiladas, se dimerizan y se translocan al núcleo, estimulando la expresión de los genes inducibles por citocinas.¹²⁸

Figura 12. Vía JAK / STAT



Nature Reviews | Immunology

Ke Shuai & Bin Liu. Nature Reviews 2009

La familia de JAK/STAT está regulada negativamente por SOCS/CIS, que se une al dominio quinasa de JAK. Otros reguladores negativos de la ruta son las protein-fosfatasa CD45 y PTPeC (*protein tyrosine phosphatase-C*).¹²⁹

La desregulación de la vía JAK/STAT ha sido descrita en una gran variedad de enfermedades hematológicas, especialmente en patologías de estirpe mieloide. Esta desregulación puede deberse a mutaciones o reordenamientos del gen con otros genes. De las mutaciones descritas en la literatura una de las más importantes es la que se asocia a neoplasias mieloproliferativas, $JAK2^{V617}$. Esta vía está siendo objeto de estudio en el tratamiento de neoplasias mieloproliferativas, existiendo ya comercializados inhibidores como el ruxolitinib, inhibidor de JAK1 y JAK2.¹³⁰ Por otro lado, la activación constitutiva de STAT1, 3 y 5 también se ha demostrado en blastos de LMA pudiendo jugar un importante papel en la patogénesis de esta enfermedad.¹³¹

3.11 VÍA DE LAS PIM QUINASAS

Las PIM quinasas son una familia de serin/treonin quinasas implicadas en la fosforilación y regulación de numerosas proteínas que son esenciales para la progresión del ciclo celular, metabolismo celular y apoptosis. Se ha descrito el aumento, tanto de PIM1 como de PIM2, en distintas enfermedades hematológicas, y en alguna de ellas parece correlacionarse con un peor pronóstico, como es el caso del linfoma difuso de células grandes B (LDCGB).¹³² En el caso de PIM1 se ha descrito que colabora con c-myc induciendo linfomagénesis en ratones.¹³³ Además, recientemente se ha documentado que estas quinasas son esenciales en el desarrollo y mantenimiento de LLC. Tanto PIM2 como PIM3, se han relacionado con la supervivencia de la célula tumoral, mientras que PIM1 está implicada en las relaciones de la célula tumoral con el micromedioambiente.^{134,135} En el caso de LLC se ha descrito la sobreexpresión de PIM2 en linfocitos de LLC en comparación con linfocitos normales¹³⁵ en pequeñas series de pacientes. Por otro lado y en relación con lo anterior, el uso del pan-inhibidor de PIM quinasas, SGI-1776 ha resultado eficaz en LLC, induciendo muerte celular *in vitro* en linfocitos de pacientes con esta enfermedad¹³⁶. Por todo ello, las proteínas PIM quinasas podrían tener un papel importante en el desarrollo, evolución y resistencia a fármacos de la LLC, pudiendo utilizarse como diana terapéutica en su tratamiento.

4 FÁRMACOS

De las moléculas disponibles en nuestro laboratorio, elegimos algunas que ya habían sido estudiadas por nuestro grupo y habían demostrado ser eficaces en otras neoplasias hematológicas, como MLN-9708, Zalypsis y PIM447.

Por otro lado, también decidimos profundizar en el estudio de EDO-S101, una molécula recientemente sintetizada (Mundipharma-EDO GmbH) y con datos muy preliminares de eficacia en neoplasias hematológicas.

Los principales fármacos utilizados en este trabajo de investigación se enumeran y se describen a continuación. Otros fármacos que se han utilizado para realizar estudios en combinación se describen en los capítulos correspondientes.

4.1 MLN9708- IXAZOMIB

Se trata de un inhibidor del proteasoma de segunda generación, que inhibe principalmente la actividad quimiotripsina de la subunidad 20S del proteasoma. En estudios preclínicos ha demostrado un mejor perfil de farmacocinética y farmacodinamia, consiguiendo mayor penetración en tejidos en comparación con bortezomib¹³⁷. Además es el primer inhibidor del proteasoma de administración oral. Hasta la fecha dos fase I/II indican que MLN-9708 tiene un buen perfil de seguridad y que es eficaz en pacientes con MM recaído/refractario^{138,139} en monoterapia, y también en combinación en pacientes de nuevo diagnóstico.¹⁴⁰ La combinación de ixazomib con lenalidomida y dexametasona ha demostrado ser superior a lenalidomida y dexametasona en pacientes con MM en recaída en el estudio Tourmaline-1,¹⁴¹ lo que ha llevado a su reciente aprobación para el tratamiento de estos pacientes tanto por las autoridades americanas como europeas.

4.2 ZALYPSIS

Es un nuevo compuesto alquilante, derivado de organismos marinos, cuya acción antitumoral ha sido demostrada tanto *in vitro* como en ensayos clínicos en distintas enfermedades neoplásicas. En el caso del MM cabe destacar los excelentes resultados preclínicos demostrados en nuestro laboratorio. En el ensayo clínico fase I en pacientes en recaída o refractarios aunque se observó un efecto antimieloma fue limitado por las dosis utilizadas. Este efecto del fármaco fue evidente, sobretodo, en combinación con dexametasona.

En cuanto a su mecanismo de acción, Zalypsis ha sido estudiado por nuestro grupo tanto en LMA como en MM. En LMA se ha observado que

induce apoptosis por vías dependientes e independientes de caspasas. El análisis del perfil de expresión génica tras tratamiento de las células tumorales con el fármaco, permitió identificar una expresión diferencial de genes implicados en el reconocimiento de roturas de doble hebra de ADN, genes del complejo de anemia de Fanconi o BRCA y también genes implicados en la reparación de dichas roturas, como RAD51, RAD54 y BRCA2.¹⁴²

En MM, nuestro grupo ha descrito su eficacia tanto *in vitro* como *in vivo* mediante la inducción de daño sobre el ADN (roturas de doble hebra), sobreexpresión de p53 e inducción de apoptosis y parada del ciclo celular. El análisis del perfil de expresión génica también mostró datos de desregulación de numerosos genes implicados en la respuesta a daño en el ADN.¹⁴³

4.3 EDO-S101

Es una molécula híbrida que combina una molécula con acción alquilante (bendamustina) y un inhibidor de histona deacetilasas (vorinostat). Ensayos clínicos recientes han demostrado que la bendamustina es segura y eficaz en síndromes linfoproliferativos (SLP), pero también en pacientes con MM en recaída o refractario tanto en monoterapia,¹⁴⁴ como en combinación con otras drogas como bortezomib^{145,146,147} e inmunomoduladores.^{148,149,150}

Por otro lado se ha demostrado que la acetilación de histonas es un cambio epigenético que se encuentra desregulado en varios cánceres y que esto afecta la expresión de genes supresores de tumores y oncogenes.¹⁵¹ Inhibidores de HDAC como vorinostat han demostrado actividad clínica en combinación con bortezomib¹⁵² o lenalidomida¹⁵³, y otros como panobinostat, han demostrado eficacia preclínica¹⁵⁴ y también actividad clínica¹⁵⁵ en MM. La combinación entre inhibidores de HDAC con agentes alquilantes no ha sido testada en ensayos clínicos, pero sí se ha demostrado su sinergia *in vitro*¹⁵⁶. La hipótesis en la que se basa el diseño de EDO-S101 es que el inhibidor de HDAC permitirá una estructura más abierta o accesible de la cromatina para que la bendamustina pueda inducir mayor daño sobre el ADN.

4.4 PIM447

Es una molécula pan inhibidora de las PIM quinasas (1, 2 y 3). Las PIM quinasas son proteínas implicadas en la regulación de rutas de supervivencia y resistencia farmacológica¹⁵⁷. Además de ser ya conocido que regulan importantes vías celulares (por ejemplo. STAT3, Wnt y NF-κB), también participan en el control de la actividad y estabilidad de proteínas implicadas en quimioresistencia (por ejemplo MDR-1 y BCRP). Diferentes estudios han descrito la sobreexpresión de las PIM quinasas en tumores hematológicos¹³⁴. PIM1 estaría implicada en la diseminación de la LMA por regular CXCR4¹⁵⁸; y PIM2 se encuentra sobreexpresada y está asociada con la progresión de diferentes SLPs¹³² (como en LLC, en linfoma difuso de células grandes B (LDCGB), en el linfoma del manto) y en MM. La eficacia de PIM447 en MM ya ha sido demostrado tanto en preclínica¹⁵⁹ como en un ensayo clínico fase I en pacientes con MM en recaído o refractario con buenos resultados de eficacia en monoterapia y buen perfil de tolerancia,¹⁶⁰ lo que valida el potencial desarrollo clínico de esta molécula en otras enfermedades.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Durante los últimos años se han producido numerosos avances en el conocimiento de las bases moleculares y en el tratamiento de las neoplasias hematológicas. La aparición de anticuerpos monoclonales, como el anti-CD20 en los SLP-B; los inhibidores del proteasoma y los fármacos inmunomoduladores en el MM y los inhibidores de tirosina quinas en leucemia mieloide crónica (LMC)) han permitido que la esperanza de vida de los pacientes haya mejorado significativamente en las últimas décadas. No obstante muchos de estos pacientes recaen o presentan enfermedades refractarias al tratamiento, ya sea al diagnóstico o tras varias líneas terapéuticas previas. La existencia de vías oncogénicas de supervivencia de la célula tumoral comunes a tumores de diferentes estirpes, hace posible que algunas moléculas sean capaces de inhibir el crecimiento tumoral en diferentes neoplasias hematológicas. La investigación preclínica de la eficacia y el mecanismo de acción de nuevos agentes terapéuticos, tanto en líneas celulares, muestras *ex vivo* de pacientes y modelos animales, permitiría descubrir fármacos o mecanismos con una eficacia similar en distintas enfermedades, o, por el contrario, permitirá descubrir algunos que puedan ser más específicos de algunos tumores. Estos estudios, además podrían proporcionar las bases necesarias para el diseño de ensayos clínicos con el objetivo de mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes. Además, el estudio de posibles sinergismos farmacológicos que permitieran actuar sobre distintas vías oncogénicas simultáneamente, podría contribuir a descubrir combinaciones con potente efecto anti neoplásico que también podrían trasladarse a la clínica en forma de ensayos clínicos. Además, el estudio de estos fármacos con nuevos mecanismos de actuación, permitiría conocer mejor la patogenia de algunas de estas enfermedades y también descubrir biomarcadores que pudieran ser utilizados para predecir la sensibilidad o resistencia de las diferentes enfermedades hematológicas a los tratamientos dirigidos disponibles. Basándonos en estas hipótesis, en este trabajo de investigación se plantean los siguientes objetivos.

2. OBJETIVOS

1. Establecer un protocolo preclínico de estudio de nuevos fármacos antitumorales y sus combinaciones en neoplasias hematológicas.
2. Realizar un cribado de la eficacia anti neoplásica de nuevas moléculas con diversos mecanismos de actuación, que solas o en combinación puedan resultar eficaces frente a MM, SLP-B o LMA. Los principales mecanismos evaluados serán:
 - 2.1. Vía de la ubiquitina-proteasoma
 - 2.2. Fármacos inductores de daño sobre el ADN
 - 2.3. Inhibidores de deacetilasas de histonas
 - 2.4. Inhibidores específicos del ciclo celular
 - 2.5. Vía PIM quinasas
3. Evaluar la eficacia preclínica de EDO-S101, una nueva molécula con actividad alquilante e inhibidora de deacetilasas de histonas en modelos preclínicos de MM y de LMA.
4. Estudiar el potencial sinergismo y los principales mecanismos responsables, de la combinación de zalypsis (un compuesto marino que induce un potente daño en el ADN) con bortezomib y dexametasona.
5. Evaluar la importancia patogénica de las PIM quinasas en los diferentes estadios evolutivos de la LLC y la eficacia preclínica del pan-inhibidor de estas proteínas, PIM447, en células procedentes de pacientes con esta enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CÉLULAS

1.1 LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares de MM que se utilizaron fueron MM1S y MM1R, donadas por el Dr. S. T. Rosen (Northwestern University, Chicago, IL, USA)¹⁶¹; RPMI-8226, U266, RPMI-LR5 y U266-LR7 donadas por el Dr. W. S. Dalton (Moffitt Cancer Center, Tampa, FL, USA)^{162,163} y JLN3 de DMSZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany). Las células MM.1S-luc, con expresión estable de luciferasa, fueron cedidas por el Dr. C. Mitsiades (Dana-Farber Cancer Institute, Harvard University, Boston, MA, USA). Las líneas de LMA que se utilizaron fueron HEL, KG-1, MV4-11 y HL-60, compradas a DSMZ. Las líneas celulares de SLP-B utilizadas fueron SUDHL-6, MEC-1, JVM-2 y JEKO-1 de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Todas ellas se cultivaron en atmósfera húmeda en presencia de 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C, en medio RPMI1640 (excepto la línea MEC-1 que se cultivó en medio IMDM) suplementado con 2 mM de L-glutamina, 10% de suero bovino fetal (SBF) y antibióticos (penicilina a 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml (Invitrogen Corporation, Gaithersburg, MD, USA), en placas de 9 cm de diámetro. Las características de cada línea celular se resumen en la **Tabla 3** (MM), **Tabla 4** (LMA) y **Tabla 5** (SLP-B).

Tabla 3. Líneas celulares humanas de Mieloma Múltiple

Línea	Tipo	Características
MM1S	Mieloma Múltiple	- Sensible a Dexametasona - p53 wild type (WT). - Citogenética: -1p22.1-pcent, +1q21.2 / +1q21.3 / +1q44,-2q37-qter, +3q27.2-qter, -6q24.2-q26, +7q31.33-qter,-8q21.3-q23.3, -9p23-p21.3, +9q31.1, -12q24.11-q24.23 / -12q24.31-qter, -13q, -14q, +16q22.1 / -16q23.1-qter, -17q25.1-q25.3 , +18q21.1,+21q22.11-q22.3, t (14; 16) , Tx IGH.
MM1R	Mieloma Múltiple	- Resistente a Dexametasona - p53 wild type (WB). -Citogenética: -1p22.1-pcent, +1q21.2 / +1q21.3 / +1q44,-2q37-qter, +3q27.2-qter, -6q24.2-q26, +7q31.33-qter,-8q21.3-q23.3, -9p23-p21.3, +9q31.1, -12q24.11-q24.23 / -12q24.31-qter, -13q, -14q, +16q22.1 / -16q23.1-qter, +18q21.1,+21q22.11-q22.3, t (14; 16) , Tx IGH.
OPM-2	Mieloma Múltiple	- Cariotipo hipertriploide/hipotetraploide - t(4;14) asociado a IGH/FGFR3 - Delección en PTEN - AKT activado - p53 mutado (WB). - Citogenética: -1p21.1-pcent, +1q, -5q21.1-q23.1 / -5q31.1-qter, -8q21.3-q23.3, +9q31.1, +10p, +12q13.11, -13qcent-q31.1, -14q12 / -14q13.1 / -14q21.1-q23.2, +16q22.1, -17p13.2 , +18q21.1., Tx IGH.
U266	Mieloma Múltiple	- Las células expresan ARN _m del gen BCL - Produce IgE lambda e IL-6. - Del RB. - p53 mutado (WB). - Cariotipo hipodiploide con 6,5% de poliploidía. - Citogenética: +1qcent-q25.3 / +1q44, +3q25.1 / +3q26.3-qter, -4q22-qter / -4q33-qter, +7p14.1-p12.2, +7q32.1-q34, -8p21.3-p12, +8q24.1-q24.2, +9q31.1-q33.3, -10p12.1-p11.21, -11q21.1-qter, -12pter-p12.3, -13qcent-q21.33 / -13q33.3-qter, -14q22.1-q24.2, +15q15.1-q15.3, - 17p , +17q22-q23.3, +21q21-q22.3, -22q13.31.
U266-LR7	Mieloma	- Parcialmente resistente a Melphalan. - p53 mutado (WB). - Citogenética: +1q21.2 / +1q21.3 / +1q44, +3pter-p24.2, +3q27.2-qter, -4q22-qter / -4q33-qter,-5q21.1-q31.1 / +5q33.3-qter, +7p14.1-p12.2,-8p21.3-p12, +8q24.1-

RPMI 8266	Mieloma Múltiple	- p53 mutado (WB). - Cariotipo hipotriploide con 7,5% poliploide - 14 q+ - C-KIT + - Citogenética: -1p21.1-p13.2, +1q21.2 / +1q21.3,-2q37-qter, +3p21.31, +3q25.1-q26.33, +6pter-p22.1, +7q32.1 / +7q36, -8pter-p12, -8q11.23-q21.11, -10q26.2-q26.3, +11q13-q14 / -11q24.2-qter, -13q,-14q32.2, +16q22.1, +18q21.1.
RPMI 8226-LR5	Mieloma Múltiple	- Parcialmente resistente a Melphalan - p53 mutado (WB). - Citogenética: -1p22-p13.2, +1q, +3q25.1-q25.2, -4q31.3, -5p14, +6pter-p22.1// +6p21.1-q14, +6q15-qter, -8p23-pcent, -8p23-pcent, -10q21.1-q22.3 // -10q26.2, +11q14.1, -13q, -14q23.2// -14q32.12, -16q21 // +16q22.1, +18q21.1, +20q13.12, +22q.
MM1S-GFP-luc +	Mieloma Múltiple	-Sensible a Dexametasona. -Expresan luciferasa y GFP.

Tabla 4. Líneas celulares humanas de Leucemia Mieloide Aguda.

Línea	Tipo	Características
HL-60	- Leucemia Mieloide Aguda con Maduración	- C-MYC amplificado
MV4-11	- Leucemia Monocítica Aguda	- t (4;11) - AF9/MLL - FLT3- ITD
HEL	- Leucemia Eritroide Aguda	- JAK2 ^{V617F} mutado
KG-1	- Leucemia Eritroide Aguda	- Fusión de FGFR1

I

Tabla 5. Líneas celulares humanas de neoplasias linfoides B.

Línea	Tipo	Características
MEC-1	<ul style="list-style-type: none"> - Linfoma Linfocítico de Células Pequeñas. -Leucemia Linfocítica Crónica de las Células B. 	<ul style="list-style-type: none"> - 10% de poliploidía
JVM-2*	<ul style="list-style-type: none"> - Linfoma Linfocítico de Células Pequeñas. - Leucemia Linfocítica Crónica de las células B. - Linfoma de células del Manto* 	<ul style="list-style-type: none"> - Restricción de la cadena ligera λ de las inmunoglobulinas. - t(11;14) asociada a sobreexpresión de ciclina D1
SU-DHL-6	<ul style="list-style-type: none"> - Linfoma Folicular 	<ul style="list-style-type: none"> - t(14;18) - IGH-BCL2
JEKO-1	<ul style="list-style-type: none"> - Linfoma de las Células del Manto 	<ul style="list-style-type: none"> -Reordenamiento de las cadenas de IGH y CCND1

1.2 CÉLULAS DE PACIENTES

Las células procedentes de pacientes se obtuvieron bien a partir de aspirados de médula ósea (MO) en el caso de pacientes con MM, o bien de muestras de sangre periférica de pacientes con LLC o linfocitosis B monoclonal (LBM). Todas las muestras de pacientes se obtuvieron tras la aprobación y revisión del Comité Ético del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca y bajo consentimiento informado de los sujetos participantes. Las muestras se lisaron con cloruro de amonio y se mantuvieron durante 24 o 48 horas en frascos de cultivo de 75 cm² en medio RPMI1640 suplementado con penicilina, estreptomina y con un 20% de SBF, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de los fármacos en estudio. Todas las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO² al 5 %.

2. FÁRMACOS Y CONTROLES

- **MLN9708 (Ixazomib).** El inhibidor del proteasoma de segunda generación fue provisto por la farmacéutica Millenium Pharmaceuticals Inc (The akeda Company). Con él se realizaron estudios *in vitro*. A las muestras control se les añadió PBS como vehículo del fármaco.
- **Zalypsis.** El fármaco fue cedido por la empresa Pharmamar SA. y se utilizó en experimentos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. El medio vehículo que se empleó en las células y en los ratones control fue una dilución que contenía sacarosa, KH₂PO₄, H₃PO₄ y agua estéril para inyección.
- **EDO-S101 (NL-101).** Este fármaco fue provisto por la empresa Mundipharma Pharmaceuticals SL. El medio control utilizado en los experimentos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* fue una disolución con 15% HPBCD, 1.5% ácido acético y 1.25% NaHCO₃.
- **PIM447.** El fármaco lo proporcionó la empresa Novartis Oncology. Como vehículo del fármaco en los experimentos *in vitro* y *ex vivo* de empleó PBS.

3. MEDIDA DE LA VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad de las líneas celulares tras el tratamiento con los distintos fármacos se determinó mediante ensayos de reducción del compuesto MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide*). El ensayo de MTT es un método colorimétrico que mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables. Las células metabólicamente activas reducen principalmente mediante deshidrogenasas mitocondriales la sal de tetrazolio (MTT), de color amarillo y soluble en agua, a un compuesto insoluble en agua (formazán), de color azul oscuro. Tras la reducción del MTT, las células se lisan y se solubiliza el formazán con una solución de SDS 10% HCl 0,01 M. La absorbancia de cada muestra es directamente proporcional al número de células viables.¹⁶⁴

Reactivos

- MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide, 5 mg/ml disuelto en PBS, Sigma.
- Solución de SDS al 10% p/v HCl 0,01 M.

Procedimiento

1. Se sembraron 5×10^4 células (200 μ l/pocillo) en placas de 48 pocillos.
2. Después del tratamiento con cada fármaco a diferentes concentraciones y/o tiempos, se añadieron 22 μ l de MTT a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas a 37°C.
3. Se añadieron 220 μ l de SDS 10% p/v HCl 0,01 M.
4. Se mantuvieron las placas en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente y en oscuridad hasta la disolución de las sales de formazán.
5. En algunas ocasiones la líneas celulares de mieloma se cultivaron en presencia o ausencia de IL- 6 (1 nM) o IGF-1 (10 nM) para valorar si los distintos fármacos o combinaciones a estudio eran capaces de vencer la ventaja proliferativa que confieren estos factores propios del microambiente medular del MM.¹⁶⁵
6. La absorbancia se midió en un lector de placas (TECAN), con λ de lectura a 570 nmy λ de referencia de 630 nm. Para cada ensayo concreto con cada fármaco y línea celular se analizaron al menos 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Los datos se presentan

como la media (\bar{x}) \pm desviación estándar (DE) de cuadruplicados. La concentración inhibitoria semi-máxima (IC50) del fármaco se calculó usando el software de gráficos SigmaPlot.

4. CO-CULTIVO CON CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES

Como aproximación experimental *in vitro* a la presencia del microambiente medular, el efecto de los distintos fármacos o sus combinaciones se evaluó en co-cultivos de células de MM y células mesenquimales estromales (CME) de médula ósea. Para poder determinar el efecto en la viabilidad de las células de mieloma, se utilizó la línea MM1S-luc. Las células mesenquimales estromales se obtuvieron por aislamiento y expansión *in vitro* de células mesenquimales derivadas de aspirados medulares de pacientes con MM (CMEp), como ya ha sido descrito en nuestro laboratorio.¹⁶⁶ Alternativamente también se utilizó la línea celular estromal de médula ósea hMSC-TERT, cedida por el Dr. D. Campana (Division of Immunopathology and Cell Therapy, Department of Pediatrics, National University of Singapore, Singapore).

Reactivos

- Línea celular de MM, MM1S-luc.
- Células mesenquimales estromales de paciente (CMEp) de médula ósea (MO).
- Luciferina (D-luciferin potassium salt)(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA).
- Placas de cultivo de 96 pocillos negras con fondo transparente.

Procedimiento

1. Se sembraron 1×10^4 CMEp por pocillo (100 μ l) en medio de mantenimiento de las CMEp en las placas de cultivo especificadas durante una noche para lograr una monocapa.

2. Se retiró el medio de mantenimiento de las CMEp y se sembró sobre la monocapa 2×10^4 células MM1S-GFP_{luc} en medio RPMI1640 con SBF al 10%.
3. El co-cultivo se trató durante 24 o 48 horas con diferentes concentraciones del fármaco o fármacos a estudio.
4. Después del período de incubación, se añadió el sustrato de luciferina a una concentración final de 150 $\mu\text{g} / \text{ml}$.
5. Tras 5 minutos de incubación con el sustrato, se analizó la bioluminiscencia (fotones/seg) mediante el dispositivo Imaging System Xenogen IVIS 50 (Caliper Life Sciences) .

5. ESTUDIO DEL CICLO CELULAR

El efecto de los distintos fármacos sobre la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular también fue evaluado. Para ello se sembraron 2×10^6 células (1×10^6 células/ml) para cada tratamiento en placas de 6 pocillos, según el procedimiento descrito a continuación.

Reactivos y procedimiento

1. Se recogieron y centrifugaron las células en tubos a 300 g durante 3 minutos.
2. Se lavaron las células con PBS, y se resuspendieron en 700 μl de etanol frío al 70%, incubando durante toda la noche a 4°C.
3. Al día siguiente se lavaron las células tres veces y se resuspendieron en 1 ml de PBS.
4. Se añadieron 15 μg de yoduro de propidio (IP) y 0,5 mg de RNasa A y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad.

Finalmente se adquirieron las medidas del ciclo celular utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur y el programa CellQuest (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el programa Infinicyt (Cytognos S.L.).

6. MEDIDA DE LA APOPTOSIS

6.1 LÍNEAS CELULARES

Durante la apoptosis ocurren cambios en la superficie celular que llevan al reconocimiento y fagocitosis de las células apoptóticas. Un proceso temprano es la pérdida de asimetría en los fosfolípidos de la membrana, principalmente por la externalización de la fosfatidilserina (PS), que altera la carga y la hidrofobicidad de la membrana. La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos, dependiente de Ca^{++} , que se une con gran afinidad a los residuos de PS de la membrana celular ¹⁶⁷. En una célula normal, estos residuos están en la cara interna de la membrana y son inaccesibles para la Anexina V. En la fase inicial de la apoptosis los residuos de PS quedan expuestos en la cara externa de la membrana y pueden unirse a la Anexina V; sin embargo, cuando la célula se encuentra en una fase más avanzada de apoptosis, la membrana celular se permeabiliza y el IP es capaz de marcar el ADN nuclear. Este marcaje adicional nos permite diferenciar las células que están en apoptosis temprana y en apoptosis tardía. ¹⁶⁸

Reactivos

- Human Annexin V-FITC (Immunostep, Salamanca , Spain), que contiene Anexina, IP (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y tampón de unión (Hepes/NaOH, 10 mM, pH 7,4, NaCl, 140 mM, CaCl_2 2,5 mM).
- D-PBS.

Procedimiento

1. Para la detección de apoptosis se marcaron 1×10^6 células control y 1×10^6 de las tratadas con cada droga a diferentes tiempos y dosis.
2. Se recogieron y centrifugaron a 300 g durante 3 minutos.
3. Se lavaron con D-PBS que contiene CaCl_2 y MgCl_2 (Gibco) y se resuspendieron en 200 μl de tampón de unión.
4. Se añadieron 5 μl de Anexina V-FITC y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

5. Se lavó con D-PBS, se añadieron 200 µl de tampón de unión y 10 µl de la solución de IP.
6. Por cada condición se adquirieron un total de 30.000 eventos en un citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el programa CellQuest (BD Biosciences). Para el análisis fenotípico se utilizó el programa Infinicyt (Cytognos S.L.).

6.2 CÉLULAS DE PACIENTES

1. **Lisis:** la población total de células obtenidas de aspirados de MO y sangre periférica fue lisada para eliminar los hematíes.

Reactivos

- Tampón de lisis que contiene: EDTA, KHCO₃ y NH₄Cl.
- Medio RPMI1640.
- Medio RPMI1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, 20% de SBF y 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Invitrogen Corporation (Gaithersburg, MD, USA.).

Procedimiento

1. Se mezclaron 2 ml de la muestra de MO con 7 ml de tampón de lisis y se mantuvieron a 4°C durante 15-30 minutos.
 2. Se centrifugaron a 300 g, durante 10 minutos a 4°C.
 3. Se lavaron dos veces con RPMI1640 .
 4. Se cultivaron en RPMI1640 con 20% de SBF.
 5. Se plaquearon 4×10^5 células por pocillo en 1 ml de medio y en placas de 6 pocillos.
 6. Se añadió cada fármaco y se incubó entre 24 y 48 horas.
 7. Se recogieron las células y se lavaron con 1 ml de PBS.
-
2. **Marcaje.** Para diferenciar las células a estudio (plasmáticas, blásticas o linfocitos clonales) del resto de los linajes de la MO se realizó un marcaje multiparamétrico basado en la combinación de Anexina V-

FITC y tres anticuerpos monoclonales contra antígenos asociados a las distintas neoplasias hematológicas estudiadas.

Reactivos

- En MM se utilizaron: anti-CD45-APC (BD Biosciences), anti-CD56-PE (BD Biosciences), anti-CD38-PerCP/Cy5 (BD Biosciences).
- En LLC se utilizaron: anti-CD5-PerCP/Cy5 (BD Biosciences); anti-CD19-PE (Immunostep) y anti-CD45-APC (BD Biosciences).
- En LMA se utilizaron: anti-CD34-PE (BD Biosciences); anti-CD33-perCP/Cy5 (BD Biosciences); anti-CD45-APC (BD Biosciences) o anti-CD117- perCP/Cy5 (BD Biosciences).
- En todos los paneles se utilizó Anexina V-FITC (Immunostep).

Procedimiento

1. A la muestra de paciente lisada se añadió la cantidad indicada por el fabricante para cada anticuerpo.
2. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
3. Una vez marcadas se adquirieron 50.000 eventos en un citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el programa CellQuest (BD Biosciences). Para el análisis fenotípico se utilizó el programa Infinicyt (Cytognos S.L.).

7. DETECCIÓN DE LA PÉRDIDA DE POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

La disfunción mitocondrial dentro del proceso apoptótico está frecuentemente asociada con la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Una técnica para medir alteraciones en esta membrana es el marcaje con DIOC6₍₃₎, que es un fluorocromo catiónico que se incorpora en mitocondrias con elevado potencial de

membrana mitocondrial; sin embargo, cuando la mitocondria padece una pérdida de potencial de membrana, se produce una pérdida del fluorocromo y consecuentemente, disminuye la intensidad de fluorescencia detectada por citometría de flujo.

Reactivos

- DIOC₆₍₃₎ (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide), (Molecular Probes).

Procedimiento

1. Se recogieron y centrifugaron 5×10^5 células a 300 g durante 3 minutos.
2. Se lavaron con PBS y se resuspendieron en 200 μ l de PBS.
3. Se incubaron con DiOC₆ 20 nM, durante 20 min, a 37°C, en oscuridad.
4. Se lavaron con PBS.
5. Se añadieron 10 μ l de IP (20 μ g/ml).
6. A continuación se procedió a la medida de la fluorescencia emitida por DIOC₆₍₃₎ correspondiente al potencial mitocondrial utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur y el programa CellQuest (BD Biosciences). Para el análisis de los datos se utilizó el programa Paint A Inficinty (Cytognos S.L).

8. WESTERN BLOT

8.1 Obtención de la fracción proteica

Para obtener la fracción proteica total se utilizaron 10^7 células por condición de tratamiento (10^6 células/ml).

Reactivos

- Tampón de lisis: NaCl 140 mM, EDTA 10 mM, glicerol 10%, Nonidet P-40 1%, Tris pH 8,0 20 mM, PMSF 1mM, pepstatina 1 μ g/ml, aprotinina 1 μ g/ml, leupeptina 1 μ g/ml, sodio ortovanadato 1 mM.

Procedimiento

1. Una vez transcurrido el tiempo de incubación con cada droga, se recogieron las células y se centrifugaron a 300 g durante 3 minutos.
2. Se lavaron con PBS frío.
3. Se añadieron 800 µl de tampón de lisis, se incubó el lisado 10 minutos en hielo y se centrifugaron a 15.000 g durante 10 minutos a 4°C.
4. El sobrenadante que contiene las proteínas se recogió y se conservó a -20°C.

8.2 Cuantificación proteica de los extractos celulares

Se utilizó el método diseñado por Bradford ¹⁶⁹.

Reactivos

- *Bio-Rad Protein Assay*.
- BSA (seroalbúmina bovina).

Procedimiento

1. Se prepararon alícuotas con BSA a 0, 100, 250, 500 y 750 µg/ml, para la recta patrón.
2. Se diluyó cada muestra en 1 ml de *Bio-Rad Protein Assay*, previamente diluido a 1:5 en agua.
3. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro, siendo directamente proporcional este valor a la cantidad de proteína.

8.3 Electroforesis en geles de acrilamida

Los extractos, una vez cuantificados, se utilizaron para realizar las electroforesis. Para ello se empleó la técnica llamada SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*) permite separar las proteínas de una muestra en función de su tamaño, mediante la aplicación de un campo eléctrico.^{206;207}

Reactivos

- Acrilamida: Bisacrilamida.
- 1,5M Tris-HCl pH 8,8.
- 1M Tris-HCl pH 6,8.
- TEMED

- APS (persulfato amónico)
- Tampón de carga: 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 40% glicerol, 0,05% azul de bromofenol y 5% β -mercaptoetanol.
- Tampón de migración 1X: 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicina y 0,1% SDS.
- Marcador de peso molecular de amplio rango (6,5-200 KDa) (BioRad).
- Tampón de transferencia 1X: 20 mM Tris, 192 mM glicina, 0,02% SDS y 10% metanol.
- Membranas de PVDF (Immobilon-P®, Millipore).

Procedimiento

1. Preparar los geles a un determinado porcentaje entre el 6 y 12% de acrilamida, en función del peso molecular de la proteína.
2. Se mezcló la muestra con tampón de carga y se calentó durante 3-5 minutos a 100°C antes de cargar en el gel. El tampón de carga es desnaturalizante y el SDS que contiene confiere carga neta negativa a las proteínas.
3. La electroforesis se realizó con tampón de migración 1X, en cubetas Mini-PROTEAN®III (Bio-Rad), o en cubetas grandes de tipo Sturdier, a voltaje constante de hasta 120 V o 200 V respectivamente, durante 2-3 horas.
4. Después de correr la electroforesis las proteínas se electrotransfirieron a membranas de PVDF Immobilon-P (Polivinilideno difluoruro, Millipore). La transferencia se realizó a una corriente constante de 500 mA durante un tiempo variable en función del grosor y porcentaje de acrilamida del gel.

8.4 Análisis de proteínas por Western blot: bloqueo, marcaje con anticuerpos y revelado

Reactivos

- •Tampón de bloqueo TBST-BSA (10 mM Tris pH 7,4; NaCl 150 mM; Tween 20 0,1 %; BSA 1% y N_3Na 0.05%).

- ▪Tampón de lavado TBST (10 mM Tris pH 7,4; NaCl 150 mM; Tween 20 0,1%).
- ▪Anticuerpos primarios: anti-p21, anti-p27, anti-Caspasa-3, (Santa Cruz, CA); anti-Apaf-1, anti-Caspasa-8, anti-Caspasa-9, anti-Citocromo C, anti-AIF, anti-BCL-X, anti-PARP, anti-BCL-2, y anti-BID (BD Biosciences); anti-p53 y anti-Endo G (Oncogene Science); anti-acetyl-Histone H4, anti-acetyl H3, anti-acetyl α tubulin, anti-Actina, anti-ATM, anti-ATR, anti-p-CHK1, anti-p-CHK2, anti-p-H2AX, anti-RAD51, anti-BRCA1, anti-PIM1, 2 y 3 (Cell Signalling).
- ▪Anticuerpos secundarios: IgG anti-conejo-HRP e IgG anti-ratón-HRP (Amersham).
- ▪Solución de revelado: 0,1 M Tris pH 9,35; Luminol, *p*-Iodophenol, H₂O₂ (1:20.000).

Procedimiento

1. Se bloqueó la membrana al menos durante una hora a temperatura ambiente.
2. Se incubó al menos 2 horas con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBST.
3. Se lavaron las membranas con TBST (3 lavados de 7 minutos).
4. Se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario, durante 30 minutos.
5. Se lavaron las membranas con TBST (3 lavados de 7 minutos).
6. Se incubó 1 minuto con la solución de revelado.
7. Se reveló con distintos tiempos de exposición de la membrana sobre film fotográfico.

8.5 Extracción proteica de las fracciones citosólica, mitocondrial y nuclear

Reactivos

- Tampón de lisis de homogenización (LH): 20 mM Hepes pH 7,5; Mg Cl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; DTT 1 mM; Sacarosa 250 mM; PMSF 1mM; pepstatina 1 μ g/ml; aprotinina 1 μ g/ml, leupeptina 1 μ g/ml, sodio ortovanadato 1 mM.

Procedimiento

1. Se recogieron y centrifugaron las células (30×10^6 de células por tratamiento (1×10^6 células/ml) a 300 g durante 3 minutos.
2. Se lavaron 2 veces con PBS frío y se resuspendieron en 1,5 ml de tampón de lisis de homogeneización.
3. Se pasaron las células por un homogeneizador manual 60 veces.
4. Se centrifugaron a 700 g durante 10 minutos a 4°C.
5. Se recogió el sobrenadante que contenía la fracción citoplasmática, (en el botón celular quedan los núcleos).
6. Se centrifugó a 10.000 g, durante 25 minutos a 4°C. El sedimento contiene las mitocondrias que se resuspendieron en 130 µl de LH.
7. Se centrifugó el sobrenadante a 100.000 g, durante 1 hora a 4°C.
8. Se recogió el sobrenadante que contenía la fracción citosólica y se añadieron 1,3 ml de LH.
9. Los extractos se conservaron a -20 °C.

9. ENSAYO COMETA

Para evaluar el efecto genotóxico que los distintos fármacos o combinaciones tienen sobre el ADN de las células tumorales se realizó el ensayo cometa en su modalidad alcalina.¹⁷⁰

Reactivos

- Agarosa con punto normal de fusión, *Normal melting point* 0,6% (NMP).
- Agarosa con punto bajo de fusión, *Low melting point* 0,5% (LMP).
- Tampón de lisis
- Tampón de electroforesis.
- Tampón de neutralización
- Bromuro de etidio.

Procedimientos

Preparación de las placas:

1. Se colocaron las placas en etanol 100% por lo menos una noche antes, a -20°C; se preparó la agarosa NMP y se sumergió la placa.
2. Se utilizaron 5 µl de sangre entera con 80 µl de LMP agarosa por placa.
3. Se colocó la mezcla (sangre entera + LMP agarosa) sobre la placa previamente cubierta con NMP agarosa, se cubrió con un cubreobjetos y se mantuvo a 4°C durante 8 minutos. Mientras tanto se preparó el tampón de lisis.
4. A continuación se sacó la placa de la refrigeradora, se calentó un poco y se retiró el cubreobjetos. Se colocaron 85 µl de LMP agarosa, se cubrió, y se llevó a 4°C durante 8 min. A partir de ese momento, todo se realizó bajo luz roja.

Fase de lisis de membranas celulares

1. Se sacó la placa, se retiró el cubreobjetos y se sumergió en la solución de lisis por 1 hora a 4°C y en la oscuridad.
2. Se preparó la cantidad de tampón de electroforesis necesaria.
3. Se sacaron las placas de la solución de lisis y se dejaron inclinadas para que se secan un poco.
4. A continuación se lavaron las placas con tampón de electroforesis.

Fase de desnaturalización

1. Se colocaron las placas en la cubeta horizontal de electroforesis en contacto unas con otras y evitando espacios entre ellas.
2. Se llenó la cubeta de tampón de electroforesis (600 ml), frío y recién preparado y se enrasó a un nivel aproximado de 0,25 cm por encima de las placas.
3. Se llevaron a 4°C y se dejaron las placas en este tampón básico durante 20 minutos.

Fase de electroforesis

1. Las condiciones de electroforesis fueron las siguientes: 4°C, voltaje fijo de 25 V y amperaje a 300 mA por 20min.

Fase de neutralización

1. Se sacaron las placas de la cubeta de electroforesis.
2. Se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno, con tampón de neutralización frío.
3. Mientras tanto, se preparó Bromuro de etidio.
4. Se retiró el exceso de líquido de las placas.
5. Una vez aquí ya se pudieron deshidratar las placas para fijarlas y conservarlas tiñéndolas para observarlas en ese momento o máximo 5 días después.

Fase de tinción

1. Siempre bajo una cuidadosa manipulación con guantes se agregaron de 60 µl de bromuro de etidio y se colocó el cubreobjetos.

Fase de análisis y observación

1. Se analizaron en cada caso 100 núcleos por muestra (50 por placa) al microscopio de fluorescencia utilizando el objetivo 40X.
2. Finalmente se midió la longitud del cometa desde el punto más proximal al más distal (cabeza y cola del cometa) utilizando la retícula graduada incorporada al ocular del microscopio.

*****Deshidratación y fijación de placas**

1. Se dejó escurrir el exceso de neutralización, colocando a las placas en posición vertical.
2. Se colocaron las placas en posición horizontal, se añadieron 2 ml de etanol absoluto a cada placa esperando de 4 a 5 min.
3. Se colocan las placas en posición vertical y se dejan secar hasta que se evaporó totalmente el etanol.
4. Se guardaron en una caja a temperatura ambiente por un máximo de 2 semanas

10. RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA (HR)

Para determinar la eficiencia reparadora celular mediante recombinación homóloga (*homologous recombination*, HR), tras la inducción de daño sobre el ADN se utilizaron dos líneas celulares de MM: U266HR y JLN3HR, que contienen una secuencia genética conocida, cromosómicamente integrada en su genoma y que expresaba GFP (proteína verde fluorescente), cuando se producía reparación mediante HR.⁹⁰ Se usó como control de inhibición de la vía de HR, mirin, un inhibidor de Mre11-Rad50-Nbs1, complejo requerido para completar el proceso de reparación mediante HR.⁹³

Reactivos y procedimiento

1. Se utilizaron 10^6 células JLN3HR y U266HR por transfección, que fueron pretratadas o no durante 24 horas con distintas dosis de EDO-S101.
2. Tras 24 horas, las células fueron lavadas y co-transfectadas con 5 μ g de un plásmido que expresaba I-SceI junto con 0,5 μ g del plásmido pDsRed-N1 (como control de transfección).
3. Las células se incubaron de nuevo en presencia o ausencia de EDO-S101 durante 30 horas más.
4. Transcurridas esas 30 horas las células GFP + (fluorescencia verde) y las células DsRed + (fluorescencia roja) se cuantificaron por citometría de flujo.
5. La eficiencia de HR se calculó como el cociente de células GFP + / células DsRed + (células verdes totales / células rojas totales).

11. ESTUDIO DE COMBINACIONES

Las diferentes líneas celulares fueron tratadas durante 24, 48 y/o 72 horas con diferentes dosis de los fármacos en estudio en monoterapia y en combinaciones dobles y/o triples. La sinergia de las combinaciones se cuantificó con el software CalcuSyn (Biosoft, Ferguson, MO, USA), basado en

el método de Chou-Talalay¹⁷¹ y que calcula un índice de combinación (CI) con la siguiente interpretación :

CI >1: efecto antagónico; CI =1: efecto aditivo; CI <1 efecto sinérgico

12. SEPARACIÓN CELULAR

Los linfocitos B patológicos de las muestras de LLC o LBM fueron separados de muestras de sangre periférica de pacientes y donantes sanos mediante el separador de bolas magnéticas AutoMacs Cell Separator (Miltenyi Biotec). Para la separación se utilizó el kit de microbolitas magnéticas CD19 para realizar la selección positiva, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Reactivos

- Solución de resuspensión: MACS Running Buffer.
- Solución de aclarado: PBS 2mM EDTA.
- Solución de lavado: 70% etanol, diluida a partir de etanol 100%
- Microbolitas magnéticas CD19 humano, 2 mL (Miltenyi Biotec).

Procedimiento

1. Se determinó el número de células de partida.
2. Se centrifugó la suspensión de células a 300 g durante 10 minutos y se aspiró el sobrenadante.
3. Se resuspendió el sedimento celular en 80 μ l de tampón por 10^7 células totales.
4. Se añadieron 20 μ l de microbolitas CD19 por cada 10^7 células totales.
5. Se mezclaron bien y se incubaron durante 15 minutos en el refrigerador.
6. Se lavaron las células mediante la adición de 1-2 ml de tampón por 10^7 células y se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos. Se aspiró el sobrenadante completamente.
7. Se volvieron a suspender hasta 10^8 células en 500 μ l de tampón.
8. Finalmente se procedió a la separación magnética automatizada.

13. “WESTERN SIMPLE”

Se obtuvieron lisados de células a partir de células CD19 + de pacientes con LLC, LBM o donantes sanos. La electroforesis capilar con inmunoensayo o análisis Western Simple se realizó utilizando la máquina WES™ (ProteinSimple, Santa Clara, CA USA), (Figura 13) (de acuerdo con las indicaciones del fabricante^{172, 173}).

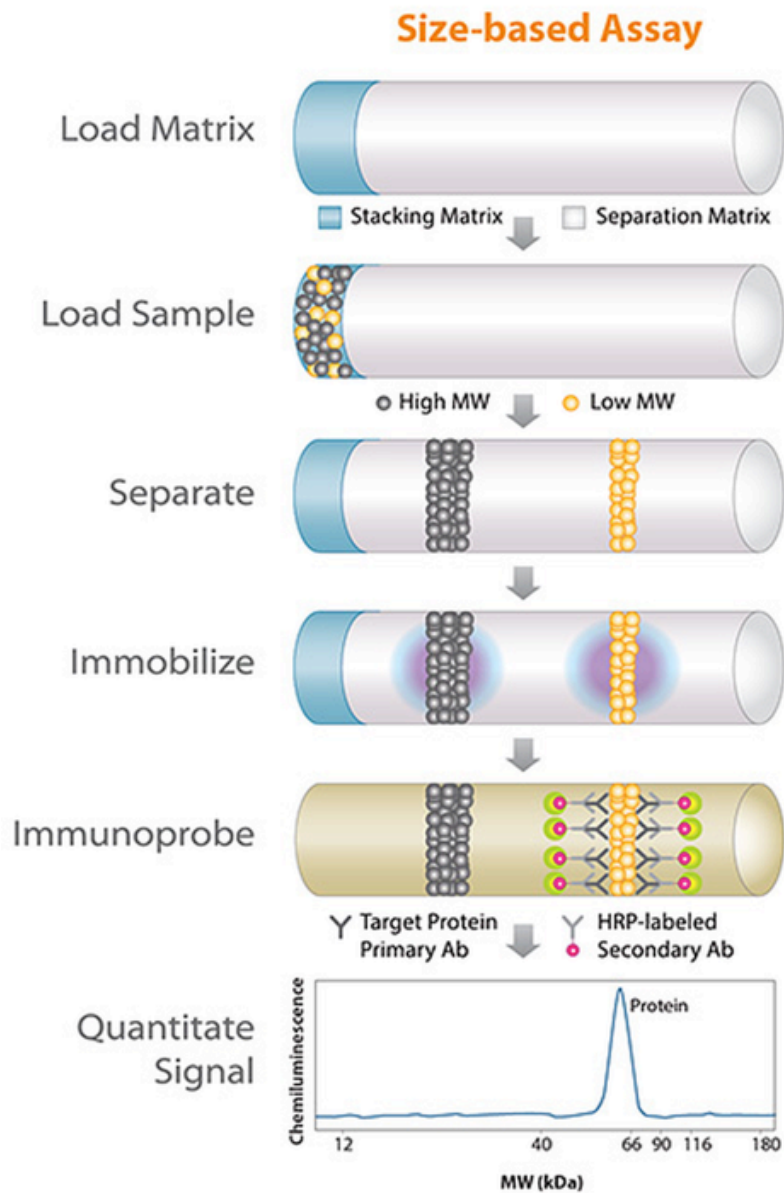
Reactivos

1. Los proporcionados en el kit West Rabbit Master 12-230 kDa (200 data points) de Protein Simple.
2. Anti-PIM2 (Cell Signalling).
3. Anti-GAPDH (Cell Signalling).

Procedimiento

1. Se mezclaron 40 µl de cada muestra con la mezcla maestra (ProteinSimple) a una concentración final de 1 x tampón de muestra, 1 x marcadores fluorescentes de peso molecular y 40 mM de ditioneitol (DTT). Después se calentó a 95 ° C durante 5 min.
2. Las muestras, los reactivos de bloqueo, el tampón de lavado, los anticuerpos primarios y secundarios y el sustrato quimioluminiscente se dispensaron en los pocillos designados por el fabricante en la microplaca del sistema.
3. Después de cargar la microplaca, la electroforesis de separación y la inmunodetección se llevaron a cabo en el sistema de electroforesis capilar de forma automatizada.
4. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el software Compass proporcionado por ProteinSimple. La normalización de los datos se realizó con la proteína GAPDH.

Figura 13. Western simple



14. MODELOS MURINOS

14.1 Modelo de plasmocitoma subcutáneo

Para el modelo de xenoinjerto de plasmocitoma subcutáneo humano, se utilizaron ratones CB17-SCID (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME USA). Los ratones fueron inoculados vía subcutánea en el flanco derecho con 3×10^6 células MM1S en una mezcla de 100 μ l de RPMI 1640 y 100 μ l de Matrigel (BD Biosciences). Cuando los tumores se hicieron palpables, los ratones fueron randomizados al grupo control (que recibe el medio vehículo), o a los diferentes grupos de tratamiento. Las mediciones de los diámetros tumorales se realizaron 3 días por semana, y el volumen del tumor se estimó como el volumen de un elipsoide utilizando la siguiente fórmula:

$$V = 4 / 3 \pi \times (a / 2) \times (b / 2)^2$$

* donde a y b se corresponden con el diámetro medido mayor y menor, respectivamente.

Las diferencias entre los volúmenes tumorales entre grupos se evaluaron mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA de un factor) y el uso de un modelo lineal general de medidas repetidas. Los ratones se sacrificaron cuando alguno de los diámetros tumorales alcanzó 2 cm, o cuando los ratones presentaron un empeoramiento del estado general. El análisis de la supervivencia se evaluó mediante curvas de Kaplan-Meier y la diferencia entre curvas se analizó con la prueba de Log-rank. Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS-20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL USA), y la significación estadística se definió como $p < 0,05$.

14.2 Modelo diseminado de MM

El mismo tipo de ratones CB17-SCID, se utilizó para generar el modelo de xenoinjerto de MM sistémico. Para su desarrollo se inyectaron 3×10^6 células MM1S-GFPluc en la vena caudal. El desarrollo del tumor fue evaluado de forma no invasiva por bioluminiscencia (BLI) con el sistema IVIS 50 Xenogen (Caliper Life Sciences, Hopkinton , MA, USA) . Cuando la carga tumoral pudo medirse por BLI (fotones/sec), los ratones fueron randomizados a los distintos grupos de tratamiento. El análisis estadístico se realizó de manera similar al usado para el análisis del modelo de plasmocitoma. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices institucionales para el uso de animales de laboratorio. Todos los protocolos y los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Salamanca.

14.3 Modelo murino de LMA

Se realizaron distintos estudios inmunohistoquímicos en tumores grandes seleccionados y extirpados de ratones controles y ratones tratados con distintos fármacos o sus combinaciones. Después de la fijación durante 24 horas en paraformaldehído tamponado al 10% (p/v), se confeccionó un *microarray* de tejido (TMA) con un arrayer manual (Instrumentos Beecher, Sun Prairie, WI), incluyendo 3 cilindros representativos de cada muestra de 1 mm de diámetro cada uno. Los TMA se incluyeron en parafina y se obtuvieron secciones de 3 μm de espesor. Después de la desparafinación en xileno y la deshidratación con concentraciones crecientes de etanol, la recuperación de antígenos y la incubación con anticuerpos se realizó con el sistema semi-automático Dako Autostainer (Dako América del Norte, Carpinteria, CA USA). Los anticuerpos primarios incluyeron anti-p53, anti-PARP fragmentada, anti-pH2AX, anti-ki67 y anti-acetyl-histone-3. (Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA). Para la visualización inmunohistoquímica se utilizó el sistema Envision (Dako América del Norte, ref K5007) basado en el uso de un polímero con anticuerpos

secundarios para IgG de ratón y conejo ligados a HRP y el uso de DAB+ como cromógeno. La tinción se realizó con el sistema de IHC DAB MAP (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ USA). Las secciones se contrastaron con hematoxilina y se analizaron por microscopía de luz estándar.

15. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Se realizaron estudios de inmunohistoquímica en tumores grandes seleccionados y extirpados de ratones controles y ratones tratados con distintos fármacos o combinaciones. Después de la fijación durante 24 horas en paraformaldehído al 10%, se realizó un microarray de tejido con un arrayer manual (Instrumentos Beecher, Sun Prairie, WI), incluyendo 3 cilindros, representativos de cada muestra, de 1mm de diámetro. Los microarrays de tejido (TMA) se incluyeron en parafina y de ellos se obtuvieron secciones de 3 μm de espesor. Después de la desparafinación en xileno y la deshidratación con concentraciones crecientes de etanol, la recuperación de antígenos y la incubación con anticuerpos se realizó con el sistema semi-automático Dako Autostainer (Dako América del Norte, Carpinteria, CA). Los anticuerpos primarios incluyeron anti-p53, anti-PARP escindida, anti-pH2AX, anti-ki67 y anti-acetyl-histone-3. (Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA). Al igual que en el modelo anterior, para visualizar la reacción inmunohistoquímica se utilizó el sistema Envision con el equipamiento IHC DAB MAP. Las secciones se contrastaron con hematoxilina y se analizaron por microscopía de luz estándar.

RESULTADOS

CAPÍTULO I. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA PRECLÍNICA DE FÁRMACOS CON NUEVOS MECANISMOS DE ACCIÓN EN DIVERSAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Este trabajo de investigación se inició realizando un cribado de la eficacia *in vitro* de algunos fármacos exponentes de los principales mecanismos de actuación descritos en la Introducción y que se encuentran en diferentes fases de desarrollo. Para realizar el estudio se utilizó un panel de líneas celulares de diversas neoplasias hematológicas. La eficacia de alguna de estas moléculas se investigó también en combinación con otros agentes utilizados en la práctica clínica habitual. Estos datos sentaron las bases de los capítulos posteriores de la presente Tesis doctoral, ya que se eligieron las moléculas o combinaciones que presentaron mejores datos de eficacia y tenían mejores perspectivas clínicas en determinadas neoplasias, para ser estudiados en profundidad.

1. MLN-9708 (Ixazomib)

La eficacia de este inhibidor del proteasoma de segunda generación fue evaluada en líneas celulares de MM (Figura 1. 1, Figura 1. 2). Se utilizaron las líneas MM1S, con p53 wt (*wild type*) y la línea RPMI 8266 con p53 mutado. Una primera observación fue la rapidez de actuación de este fármaco, ya que ejerce prácticamente todo su efecto a las 24 horas sin mejoría significativa de la eficacia con mayores tiempos de incubación (48 y 72 h). Por otro lado se observó que la línea MM1S era más sensible al

fármaco, consiguiéndose inhibiciones máximas de la viabilidad celular con dosis de 40 nM mientras que para conseguir el mismo efecto en la línea RPMI 8266 fue necesario duplicar la dosis.

Figura 1. 1 Dosis-respuesta de MLN-9708 en MM1S a distintos tiempos de exposición

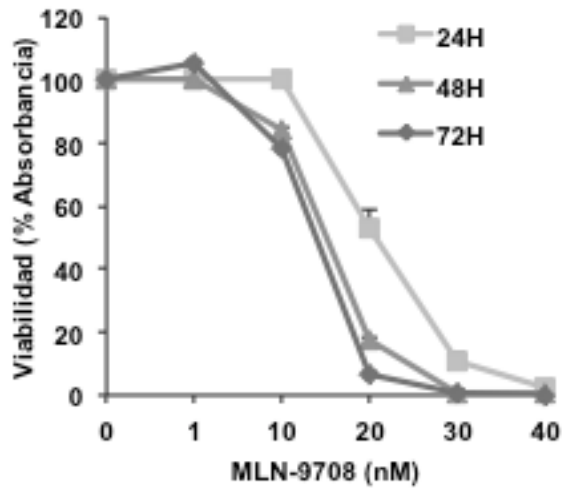
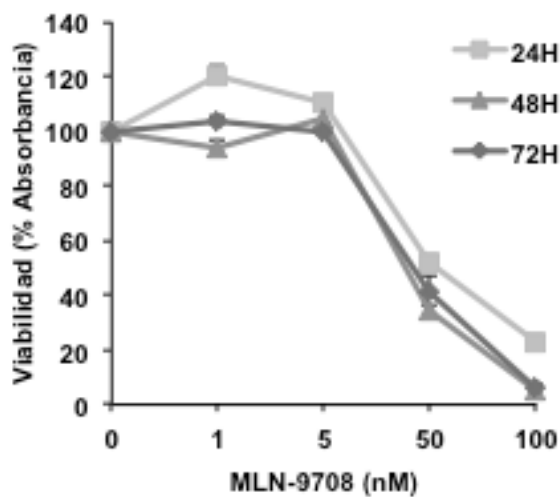


Figura 1. 2 Dosis-respuesta de MLN-9708 en la línea RPMI 8226 a diferentes tiempos de exposición



También se hizo el estudio de eficacia en líneas celulares de SLP-B (Figura 1. 3, Figura 1. 4). Para ello se utilizaron una línea de linfoma folicular (LF), SUDHL-6, y una de LLC en transformación a leucemia prolinfocítica, MEC-1. La línea de LF resultó ser más resistente al fármaco y demostró diferencias importantes de sensibilidad a distintos tiempos de incubación. La línea MEC-1 fue más sensible presentando el fármaco niveles similares de eficacia con los tres tiempos de incubación utilizados.

Figura 1. 3 Dosis-respuesta y tiempo respuesta del fármaco MLN-9708 en la línea celular SUDHL-6

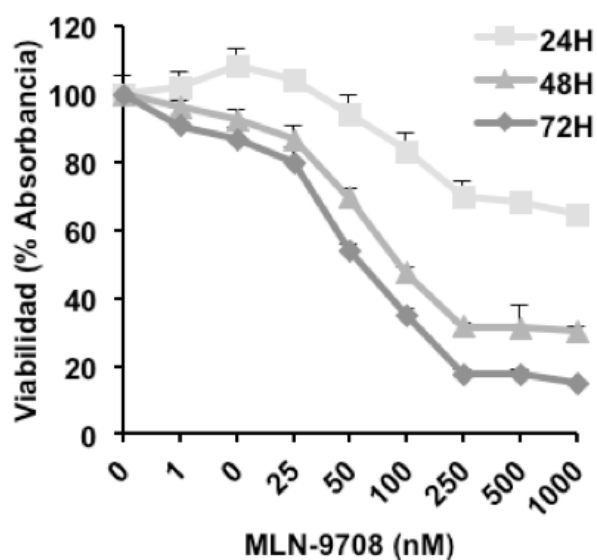
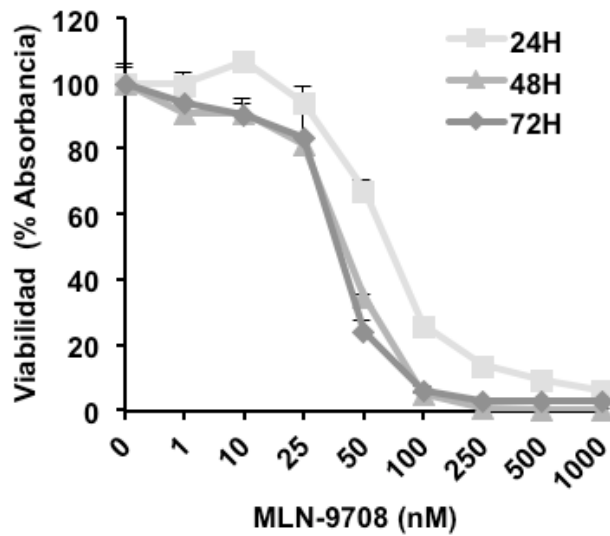


Figura 1. 4 Dosis-respuesta y tiempo-respuesta de MLN-9708 en MEC-1



Las líneas de LMA utilizadas para realizar el estudio de eficacia (Figura 1. 5, Figura 1. 6) fueron HEL, una línea de leucemia eritroide aguda JAK2^{V617} positiva, y HL60, una línea de leucemia mieloblástica aguda con maduración. De nuevo, llama la atención la gran diferencia de sensibilidad entre líneas, estando la IC50 a 24 horas en rango 20 nM en HEL frente a 250 nM en HL60.

Figura 1. 5 Dosis-respuesta y tiempo-respuesta de MLN-9708 en HEL

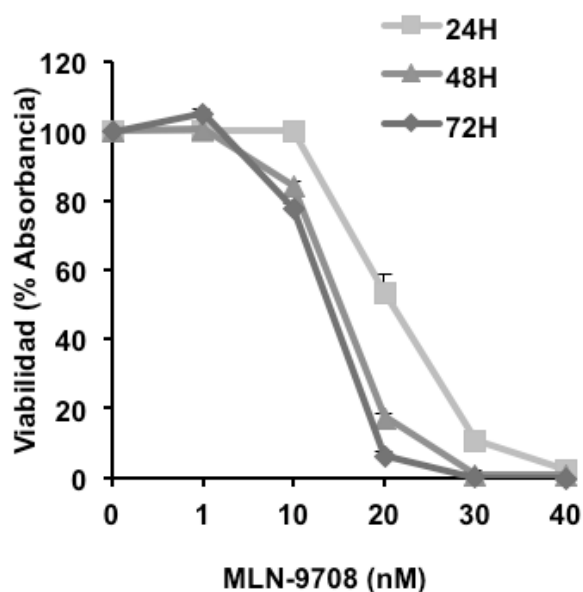
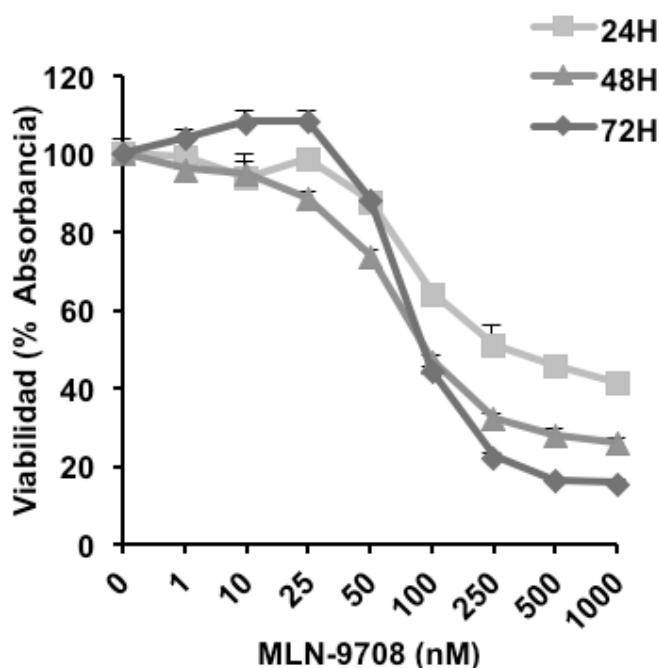


Figura 1. 6 Dosis-respuesta y tiempo-respuesta de MLN-9708 en HL60



Puesto que varios estudios ya habían demostrado la eficacia de MLN9708 en distintos modelos preclínicos de MM¹⁷⁴ y otros SLP-B¹⁷⁵, se decidió profundizar en la eficacia de MLN-9708 en LMA, ya que no había publicaciones al respecto hasta ese momento. Para ello se realizaron combinaciones con distintos agentes utilizados en el tratamiento de la LMA en la práctica clínica habitual, como idarubicina, citarabina (o Ara-C) y fludarabina (Figura 1. 7, Figura 1. 8, Figura 1. 9), buscando un posible sinergismo del efecto antileucémico de estos agentes. Para estos estudios se utilizó la línea celular HL60, que había resultado la más resistente al fármaco en el estudio inicial.

En lo que respecta al mecanismo de actuación de las drogas utilizadas para los estudios en combinación, idarubicina (Figura 1. 7) es un agente citostático perteneciente a la familia de las antraciclinas. La idarubicina forma complejos con el ADN al intercalarse entre los pares de bases, inhibiendo a la ADN polimerasa y creando roturas de doble cadena en la hélice del ADN. Por otro lado, Ara-C o citarabina (Figura 1. 8) es un análogo de la pirimidina por lo que actúa sobre la síntesis de ADN, sobre todo en células en división (fase

S). Finalmente, la fludarabina es un análogo de purina que pertenece a la clase antimetabolitos antineoplásicos al igual que la citarabina, y actúa igualmente inhibiendo la síntesis de ADN. La idarrubicina y la citarabina a pesar de haberse utilizado desde hace décadas, siguen formando la base del esquema clásico de tratamiento utilizado en la LMA en aquellos pacientes de 65 años o menores y tributarios de tratamiento agresivo; y es que, aunque en los últimos años se ha producido un avance muy significativo en el conocimiento biológico de la LMA, éste no se ha visto traducido a una mejora importante de los tratamientos frente a esta enfermedad. En cuanto a la fludarabina, se utiliza en regímenes orientados a pacientes mayores de 65 años o no candidatos a tratamiento intensivo según recomendaciones del grupo PETHEMA (Guía asistencial 2014).

Volviendo a nuestros resultados, la combinación con mejores resultados en la línea celular de LMA utilizada, fue MLN9708 + fludarabina, (Figura 1. 9) con índices de combinación entre 0,5 y 0,7 dependiendo de las dosis utilizadas (Tabla 1. 1). Se trata de un dato importante a tener en cuenta, puesto que MLN9708 es un fármaco oral, que junto con la formulación también oral de fludarabina podrían constituir dentro de un ensayo clínico un esquema o parte de un esquema terapéutico útil y cómodo en el paciente frágil o en aquel refractario a otras líneas de tratamiento. Por lo tanto esta combinación posiblemente merecería un estudio preclínico y clínico en mayor profundidad, que excede el presentado en el presente trabajo de Tesis doctoral.

Figura 1. 7 Estudio de eficacia de la combinación MLN-9708 con idarrubicina tras 48 horas de incubación

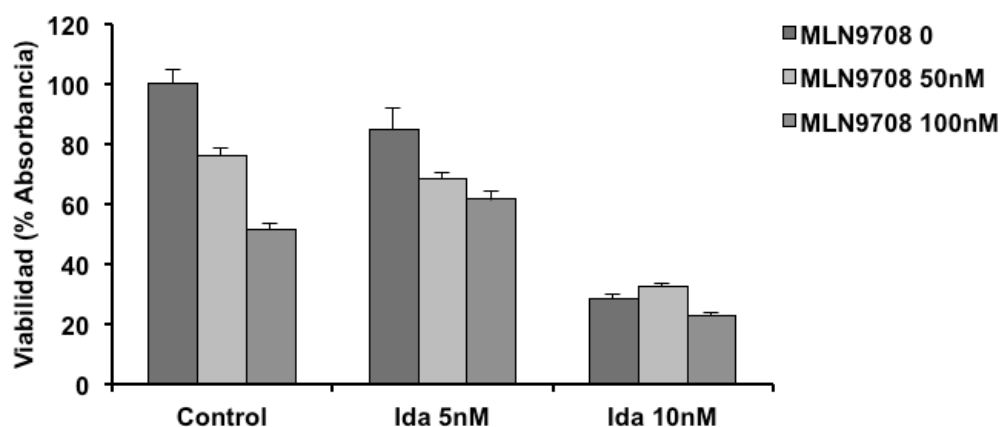


Figura 1. 8 Estudio de eficacia de la combinación MLN-9708 y Ara-C tras 48 horas de incubación

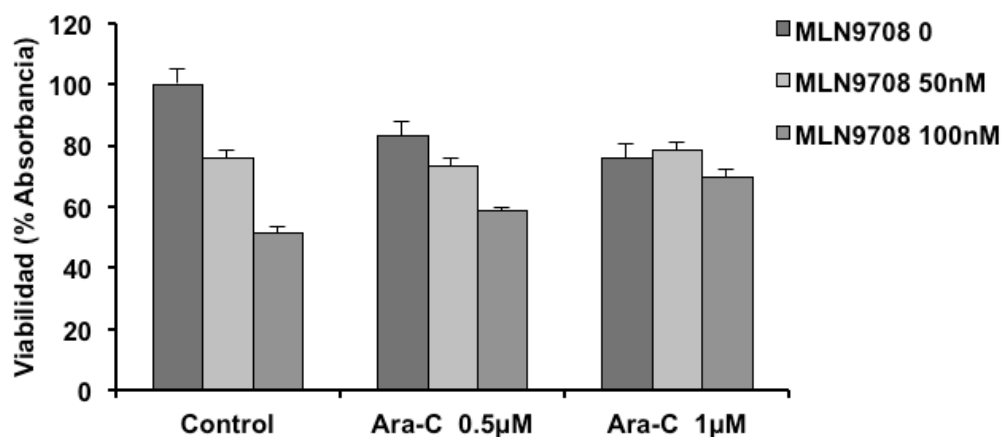


Figura 1. 9 Estudio de eficacia de la combinación MLN-9708 y fludarabina tras 48 horas de incubación

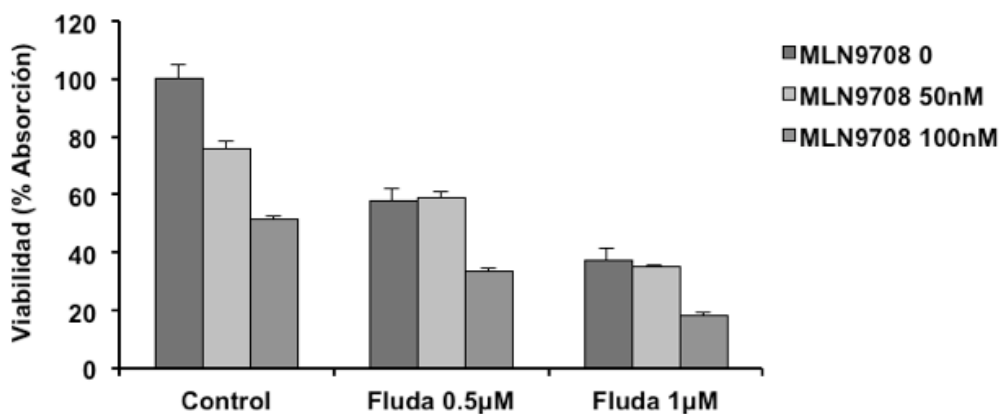


Tabla 1. 1 índices de combinación de MLN-9708 con distintos fármacos anti-leucémicos en la línea celular de LMA HL60

MLN-9708 (nM)	Idarrubicina (nM)	ICs
50	5	1,6
50	10	0,7
100	5	1,8
100	10	0,6
Ara-C (nM)		
50	500	1,5
50	1000	2,7
100	500	1,3
100	1000	2,5
Fludarabina (nM)		
50	500	1,6
50	1000	1
100	500	0,7
100	1000	0,5

2. EDO-S101 (NL-101)

EDO-S101 es una nueva molécula de fusión que no había sido probada previamente en neoplasias hematológicas y sobre la que no existía ningún dato publicado en el momento de empezar este trabajo de investigación. Evaluamos la eficacia de este compuesto en un amplio número de líneas celulares de distintos tumores hematológicos. Tras los experimentos de tiempos-respuesta iniciales, se decidió realizar los estudios a 48 horas ya que la eficacia era mejor que a 24 horas y sólo ligeramente inferior que a 72 horas (Figura 1. 10).

La molécula resultó ser eficaz tanto en MM, como en SLP-B y LMA. Las líneas de MM presentaron un IC50 entre 1,6 y 4,89 μ M, siendo la línea más

resistente RPMI8226-LR5 que tiene p53 mutado y es parcialmente resistente a melfalán (Figura 1. 11). Los IC50 en SLP-B (Figura 1. 12) y en LMA (Figura 1. 13) fueron similares, en el rango de 1,2 a 3,7 μM . Dado que la compañía propietaria del fármaco dio prioridad inicialmente a su evaluación en MM y LMA, se decidió profundizar en el estudio de su eficacia en estos tipos de neoplasias. Estos estudios se exponen en los capítulos 2 y 3 respectivamente.

Figura 1. 10 Dosis-respuesta de EDO-S101 en la línea celular MM1S a diferentes tiempos de incubación

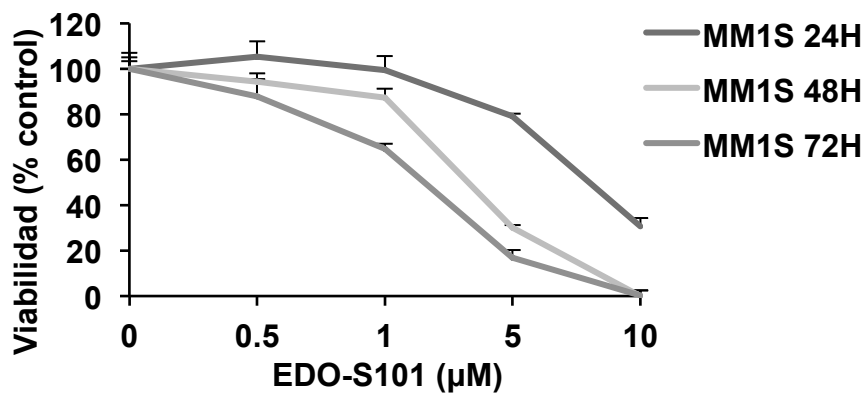


Figura 1. 11 Eficacia de EDO-S101 en diferentes líneas celulares de MM tras 48 horas de tratamiento

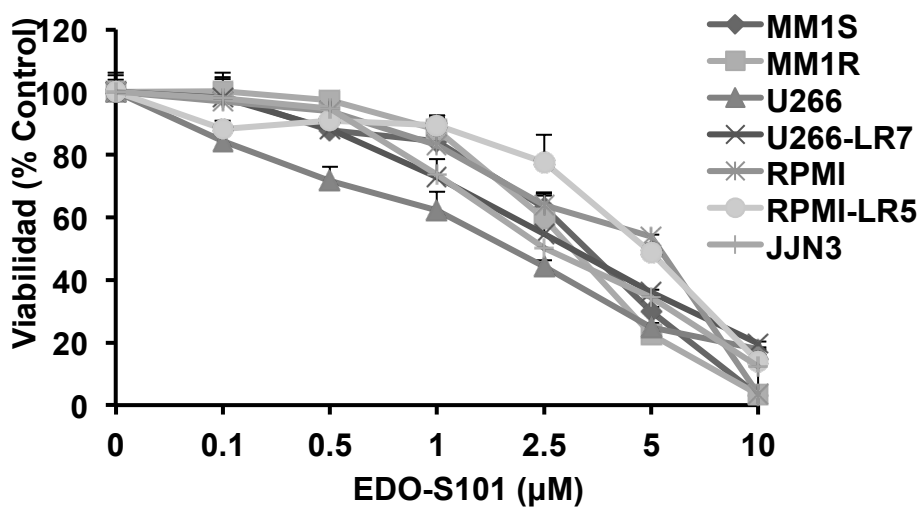


Figura 1. 12 Dosisrespuesta de EDO-S101 en líneas celulares de SLP-B tras 48 horas de tratamiento

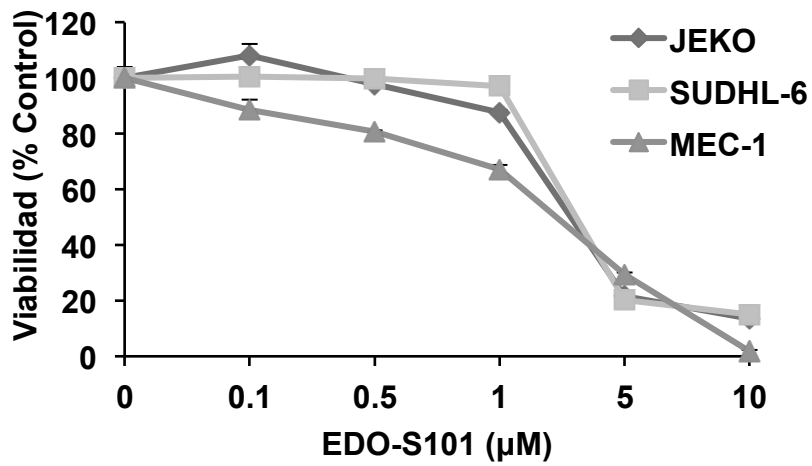


Figura 1. 13 Dosis-respuesta de EDO-S101 en diferentes líneas celulares de LMA tras 48 horas de tratamiento

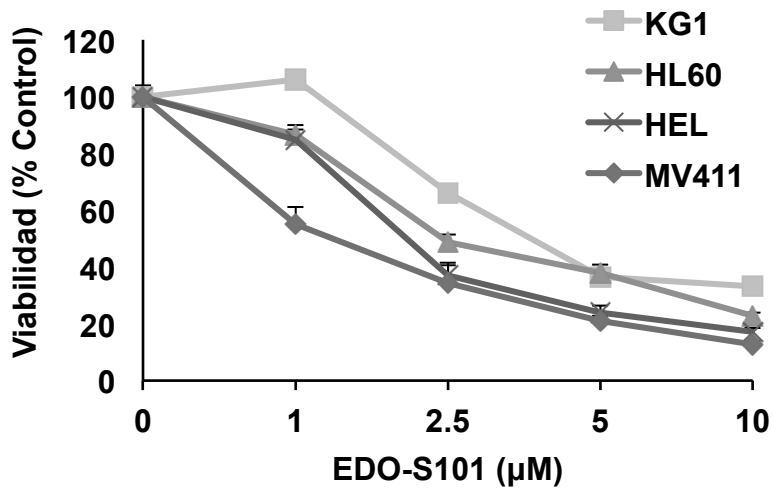


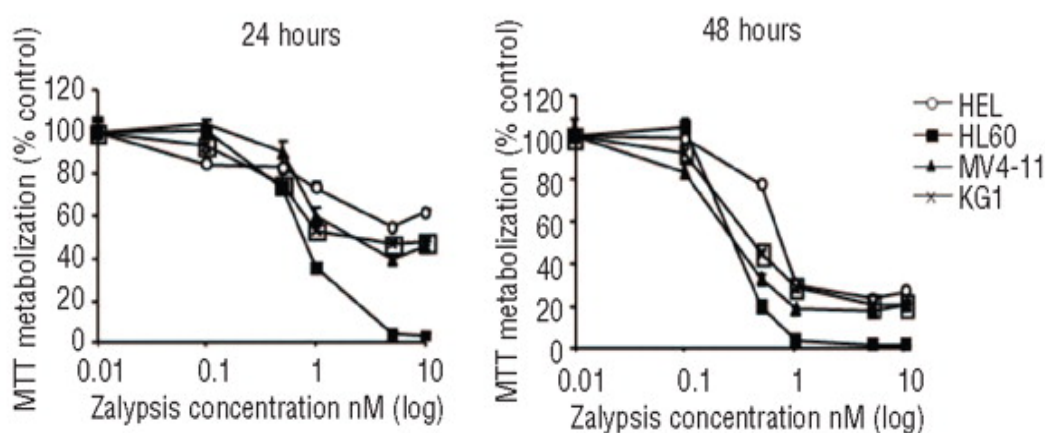
Tabla 1. 2. IC50 de EDO-S101 en las distintas líneas celulares empleadas

<u>MM</u>	IC50 (μ M)	<u>LMA</u>	IC50	<u>SLPs-B</u>	IC50
MM.1S	3,3	KG1	3,71	JEKO	2,7
MM.1R	3	HL60	2,55	SUDHL6	3,08
U266	1,63	HEL	1,83	MEC-1	2,11
U266-LR7	2,85	MV411	1,23		
RPMI8226	4,07				
RPMI-LR5	4,89				

3. ZALYPSIS (PM-104)

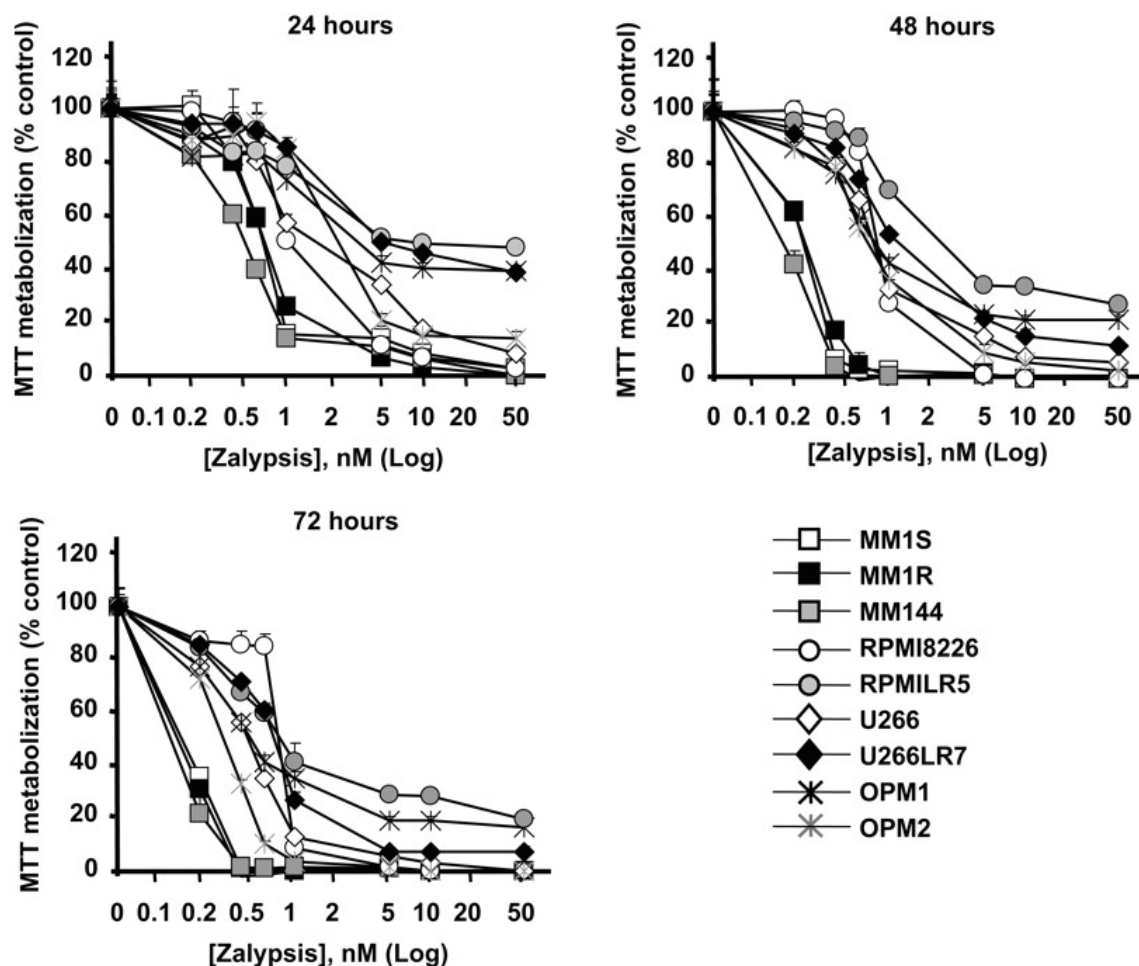
Esta molécula ya había sido evaluada previamente en nuestro laboratorio en distintas enfermedades, por lo que nos referimos a las diferentes publicaciones en MM¹⁴³ y LMA¹⁷⁶. A continuación, se expone, como referencia, una gráfica representativa de su eficacia en cada una de las neoplasias analizadas en los artículos mencionados (Figura 1. 15, Figura 1. 15).

Figura 1. 14 Eficacia de zalypsis en diferentes líneas celulares de LMA a distintos tiempos de incubación



E. Colado. Hematologica, 2011

Figura 1. 15 Eficacia de zalypsis en distintas líneas celulares de MM con distintos tiempos de incubación



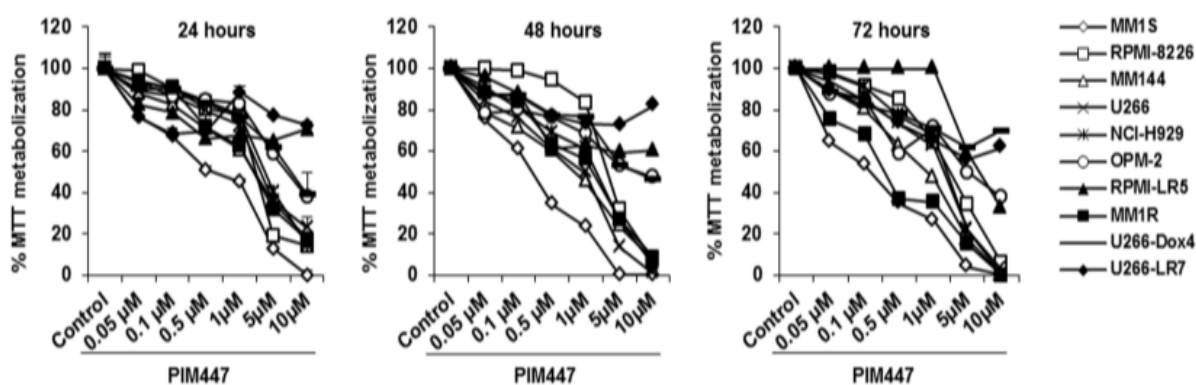
E.Ocio. Blood, 2009

Partiendo de los datos anteriormente publicados, en este trabajo se ha intentado profundizar en la sinergia de este fármaco en MM en combinación con otros fármacos con efecto anti-mieloma utilizados en el tratamiento habitual de esta neoplasia, como son el bortezomib y la dexametasona. Estos resultados se exponen en el capítulo 4 de la presente tesis.

4. PIM447

La eficacia de este pan-inhibidor de PIM quinasas se evaluó en los 3 grupos de neoplasias hematológicas previamente mencionados. En el caso del MM hacemos referencia a los estudios que ya fueron publicados por nuestro grupo en múltiples líneas de MM (Figura 1. 16).¹⁵⁹

Figura 1. 16 Dosis-respuesta de PIM447 en líneas celulares de MM a distintos tiempos de incubación



T. Paño. Clin. Cancer Res. 2016

La molécula también resultó igualmente eficaz en líneas celulares de LMA (Figura 1. 17) y SLP-B, a dosis similares (Figura 1. 18). No obstante, en Basándonos en los recientes trabajos publicados acerca de la importancia de las PIM quinasas en la supervivencia de los linfocitos B en LLC y las interacciones entre éstos con el microambiente, se decidió profundizar en el estudio de PIM447 en LLC (capítulo 5 del presente trabajo).¹³⁵

Figura 1. 17 Dosis-respuesta de PIM447 en distintas líneas de LMA tras 48 horas de incubación

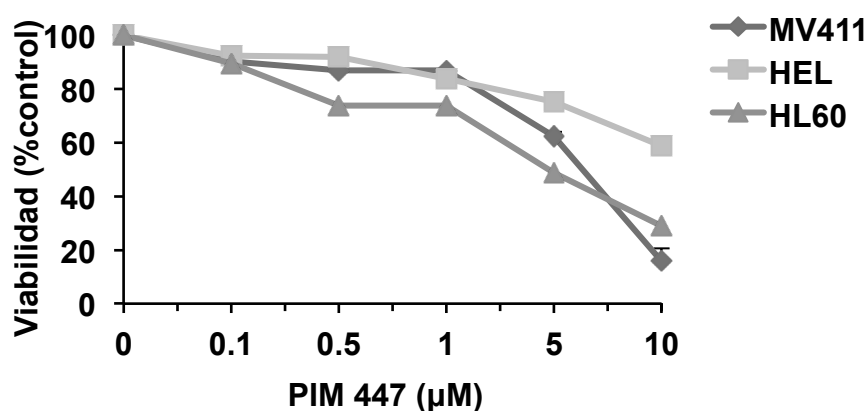
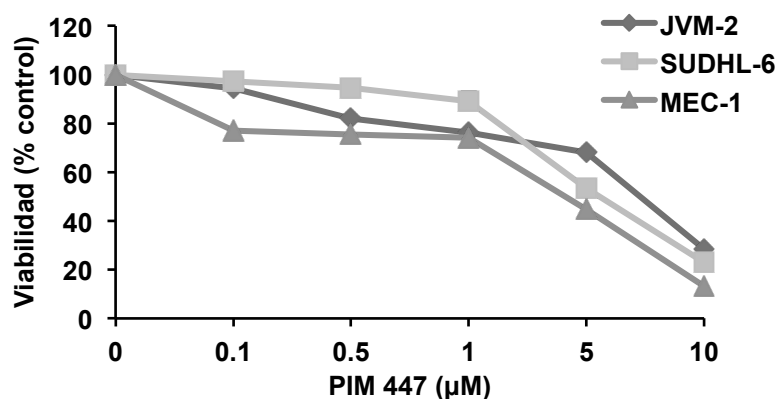


Figura 1. 18 Dosis-respuesta de PIM447 en distintas líneas celulares de SLP-B tras 48 h de exposición



5. DISCUSIÓN

En resumen, una vez realizado las pruebas de eficacia iniciales, se decidió proseguir el estudio con EDO-S101, por lo novedoso de la molécula y su potencial eficacia tanto en MM como en LMA (Capítulos 2 y 3).

Con respecto a zalypsis, los buenos datos de eficacia ya publicados por nuestro grupo en MM y los resultados preliminares obtenidos en diferentes combinaciones, hicieron que se decidiera profundizar en el estudio de la combinación de este fármaco con otros agentes con efecto anti-MM, fundamentalmente bortezomib y dexametasona (Capítulo 4).

Por último, decidimos estudiar el efecto de PIM447 como pan-inhibidor de las PIM quinasas en leucemia linfática crónica, tanto para evaluar la eficacia del fármaco como para valorar el papel de las PIM quinasas en la evolución de la enfermedad y en la resistencia a otros fármacos. (Capítulo 5).

CAPÍTULO II. ESTUDIO DE LA EFICACIA

PRECLÍNICA DE EDO-S101 EN

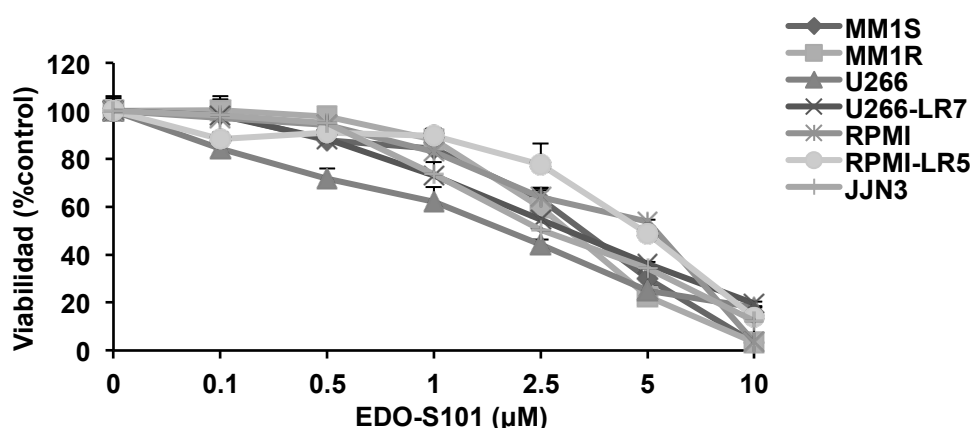
MIELOMA MÚLTIPLE

Este trabajo está en revisión para publicación en una revista del primer decil.

1. ANÁLISIS DE LA EFICACIA DE EDO-S101 *IN VITRO* Y *EX VIVO*

En primer lugar, se evaluó mediante el ensayo colorimétrico MTT la actividad citotóxica de EDO-S101 a concentraciones crecientes en siete líneas celulares de MM representativas de la enfermedad y con diferente perfil citogenético y de resistencia a fármacos (Figura 2. 1). Se tomó como referencia un tiempo de actuación del fármaco de 48 horas, ya que su eficacia anti-MM era mayor que a 24 horas y similar a la de 72 horas.

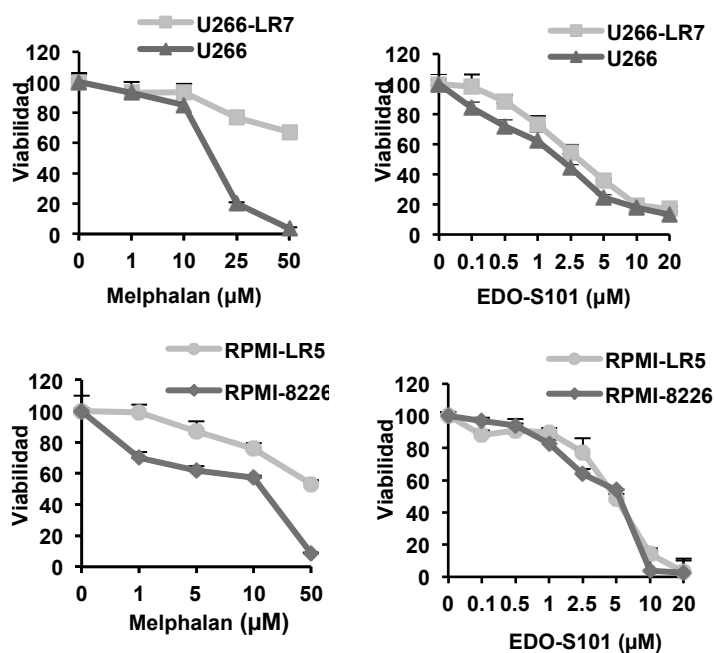
Figura 2. 1 Análisis de eficacia de EDO-S101 en distintas líneas celulares de MM (48 horas)



Las líneas celulares que se incluyeron fueron: MM1S y MM1R, sensible y resistente a dexametasona respectivamente; RPMI-8226 y U266

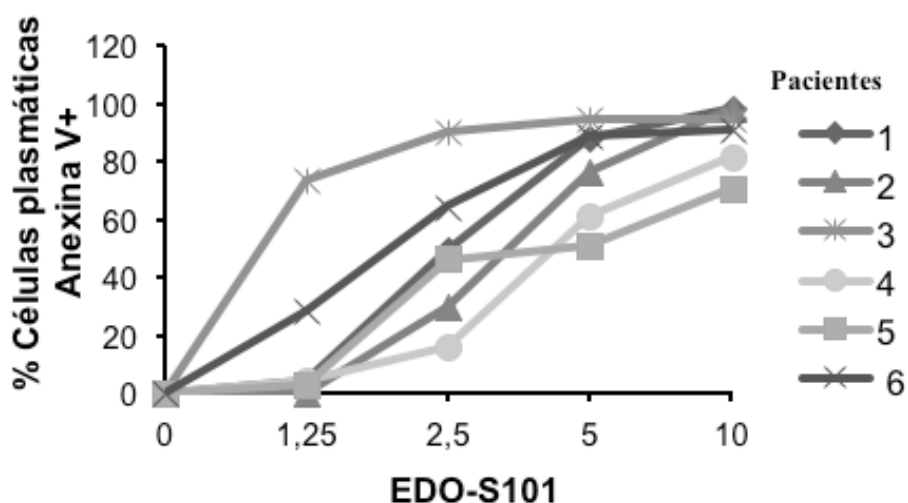
ambas con p53 mutado y parcialmente resistentes a melfalán; RPMI-LR5 y U266-LR7 ambas también con p53 mutado y con mayor resistencia a melfalán; y JLN3 sin expresión de p53 debido a una deleción mono-alélica y al silenciamiento genético del otro alelo.¹⁷⁷ El tratamiento con dosis crecientes de EDO-S101 (0,1-10 μM) durante 48 horas disminuyó la viabilidad celular en todas las líneas celulares estudiadas. Los valores IC50 de EDO-S101 fueron 3,3 μM (MM1S); 3 μM (MM1R); 1,6 μM (U266); 2,8 μM (U266-LR7); 4 μM (RPMI8226), 4.8 μM (RPMI8226-LR7) y 2,5 μM para JLN3. Las líneas celulares fueron sensibles a EDO-S101 independientemente del estado mutacional de p53. Además, se demostró que EDO-S101 *in vitro* era también eficaz en líneas celulares resistentes a melfalán. En la Figura 2. 2, se observa cómo las líneas celulares U266-LR7 y RPMI8226-LR5 son relativamente más resistentes a melfalán con respecto a su contrapartida sensible (U266 y RPMI8226), mientras que EDO-S101 no mostró diferencias de eficacia entre ambos pares de líneas (sensibles vs resistentes) indicando que es capaz de vencer la resistencia a este otro agente alquilante.

Figura 2. 2 Análisis de eficacia de EDO-S101 en líneas celulares sensibles y resistentes a melfalán



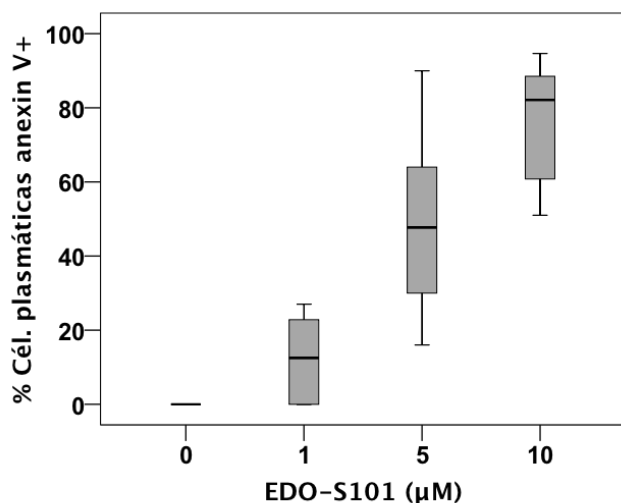
Posteriormente, el efecto de EDO-S101 se investigó *ex vivo* en células plasmáticas de médula ósea (MO) de 6 pacientes diagnosticados de MM. Los aspirados de MO que contenían células plasmáticas tumorales se incubaron con diferentes concentraciones de EDO-S101 durante 48 horas, y la apoptosis se analizó por citometría de flujo (Figura 2. 3). EDO-S101 indujo apoptosis en todos los casos, incluyendo pacientes con MM en recaída (pacientes 5 y 6) y citogenética adversa (p53 mutado, en el caso del paciente 6 y ganancia de 1q en el paciente 4).

Figura 2. 3 Análisis de eficacia de EDO-S101 en células plasmáticas de MO de pacientes con MM



En la Figura 2. 4 se muestra un diagrama de cajas en el que se representa la mediana \pm la desviación estándar (SD) de células plasmáticas apoptóticas o Annexina V+, tras incubación durante 48 horas con las dosis indicadas de EDO-S101.

Figura 2. 4 Diagrama de cajas del análisis de eficacia de EDO-S101 en células plasmáticas de MO de pacientes con MM



2. ESTUDIO DE LA EFICACIA ANTI MIELOMA DE EDO-S101 EN UN MODELO DE MICROAMBIENTE DE MM

Con el objetivo de evaluar si EDO-S101 era también eficaz en presencia de factores que ofrecen ventaja proliferativa a la célula tumoral de mieloma,¹⁶⁵ incubamos células MM1S durante 48 horas con IL- 6 (1 nM) o IGF1 (10 nM) y distintas dosis del fármaco. A pesar de la ventaja proliferativa que conferían estos factores a la línea celular MM1S, EDO-S101 mantuvo su eficacia (Figura 2. 5). También se evaluó la eficacia anti-mieloma de EDO-S101 en un co-cultivo de células MM1S-luc y células mesenquimales estromales derivadas de pacientes con MM (pBMSC). Como se observa en la Figura 2. 6, EDO-S101 fue eficaz en presencia de estas células protectoras del microambiente tumoral. Se demostró por tanto que EDO-S101 era capaz de vencer la ventaja proliferativa y anti-apoptótica conferida por algunos componentes del microambiente medular.

Figura 2. 5 Eficacia de EDO-S101 en células MM1S en presencia de IL-6 (1 nM) o IGF-1 (10 nM)

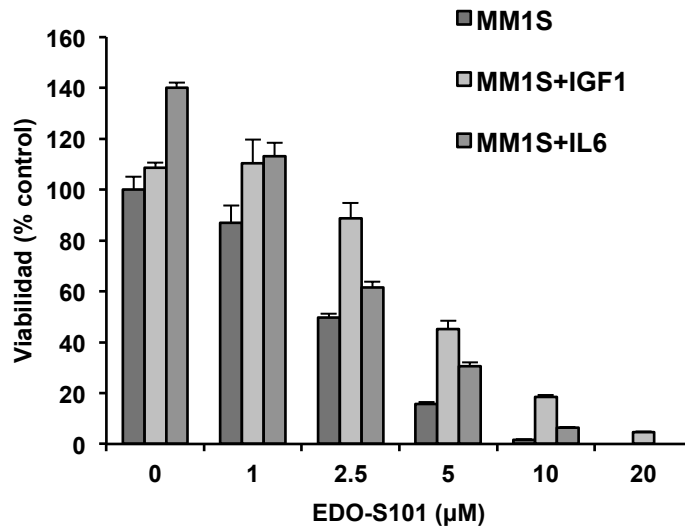
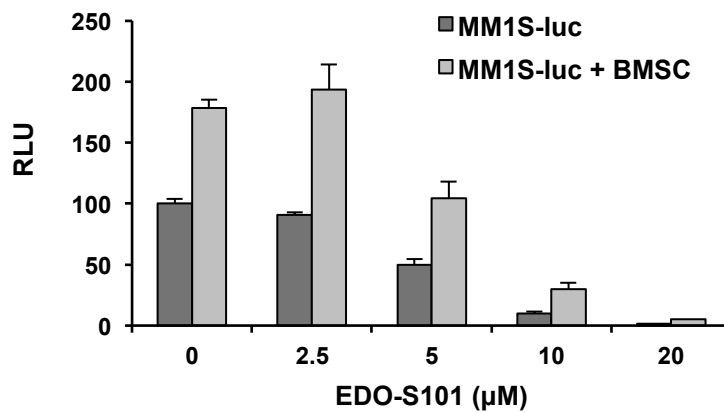


Figura 2. 6 Eficacia de EDO-S101 en MM1S-luc en co-cultivo con pBMSC

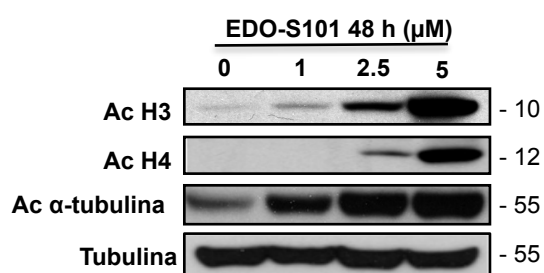
***Viabilidad celular medida por RLU (unidades de luminiscencia relativa)**



3. ANÁLISIS *IN VITRO* DE LAS PROPIEDADES FARMACOLÓGICA DE EDO-S101 COMO ALQUILANTE Y COMO INHIBIDOR DE HISTONA DEACETILASA

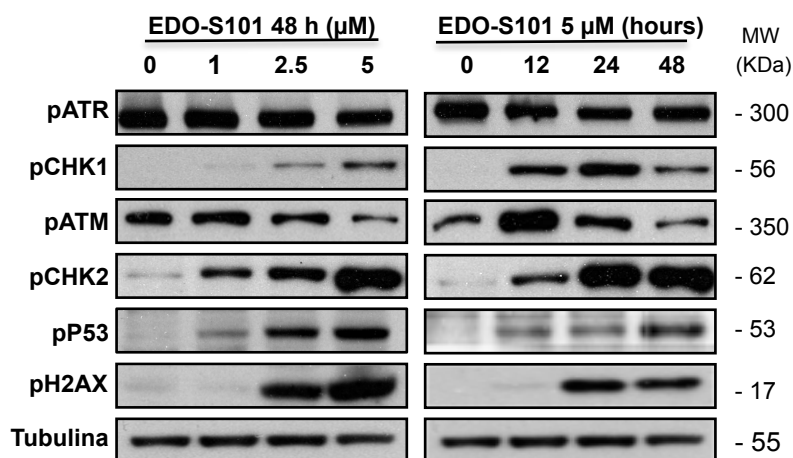
Para investigar el mecanismo de acción de EDO-S101, y teniendo en cuenta la doble naturaleza de esta molécula, se evaluaron por un lado sus efectos de acetilación sobre diferentes sustratos y por otro lado la inducción de daño sobre el ADN. El tratamiento de células MM1S con EDO-S101 a dosis tan bajas como 1 o 2,5 μM durante 48 horas aumentó notablemente la acetilación de las histonas H3 y H4 y también la de α -tubulina (Figura 2. 7).

Figura 2. 7 Hiper-acetilación de histonas y de alfa-tubulina tras 48 horas de incubación con dosis crecientes de EDO-S101



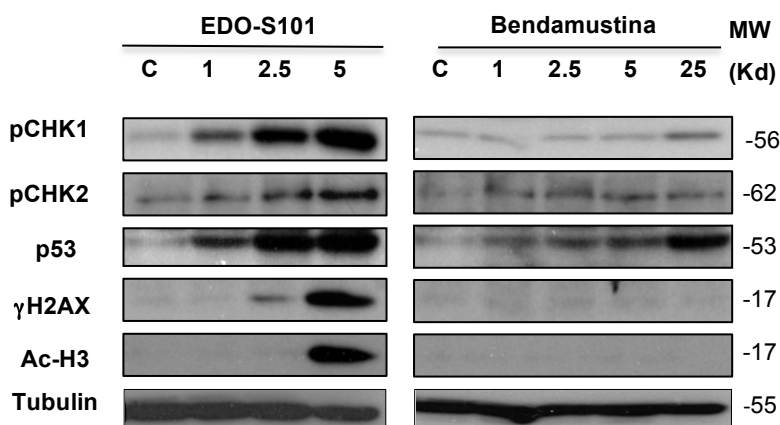
Al analizar el efecto alquilante de EDO-S101 se observó que inducía un aumento temprano en los niveles del sensor de daño p-ATM y su efector p-Chk2 en la línea MM1S, de manera dosis y tiempo dependiente. Los niveles de otro de los sensores de daño, p-ATR, no se modificaron por el tratamiento, sin embargo, su efector p-Chk1, se indujo claramente tras el tratamiento con EDO-S101 (Figura 2. 8). Tras el tratamiento también se observaron niveles elevados de p53 y p-H2AX (γ H2AX), que se puede considerar como un marcador de roturas del ADN de doble hebra (*Double Strand Breaks*, DSBs).

Figura 2. 8 Inducción de proteínas implicadas en la respuesta a daño del ADN tras incubación con EDO-S101



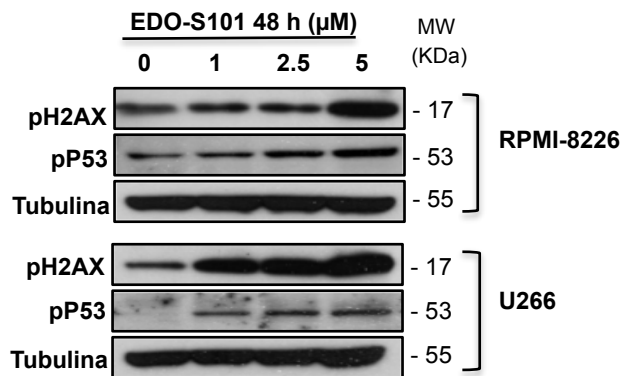
Además, se demostró que este efecto alquilante fue claramente superior al inducido por bendamustina, a pesar de utilizar dosis mucho más elevadas de este último fármaco (Figura 2. 9).

Figura 2. 9. Inducción de proteínas implicadas en la respuesta a daño tras 48 horas de incubación con EDO-S101 o bendamustina



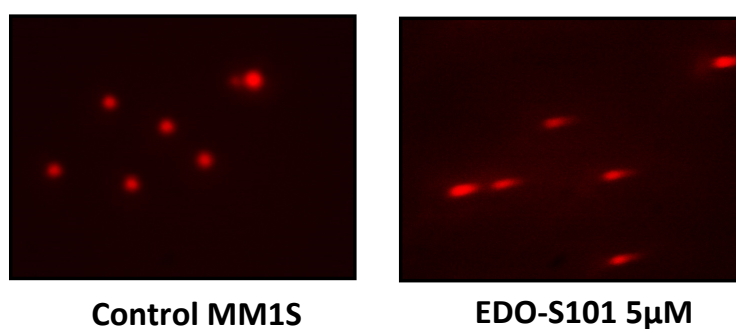
Dado que la línea celular MM1S, tiene p53 wt (*wild type*) se evaluó también este efecto de daño a ADN en dos líneas celulares de MM con p53 mutado (RPMI-8226 y U266), confirmándose los resultados previamente obtenidos (Figura 2. 10).

Figura 2. 10 Inducción de proteínas implicadas en la respuesta a daño a ADN tras 48 horas de incubación con EDO-S101 en líneas celulares con p53 mutado



En concordancia con la inducción de daño, el ensayo cometa demostró un aumento de la fragmentación del ADN después del tratamiento con EDO-S101 (Figura 2. 11).

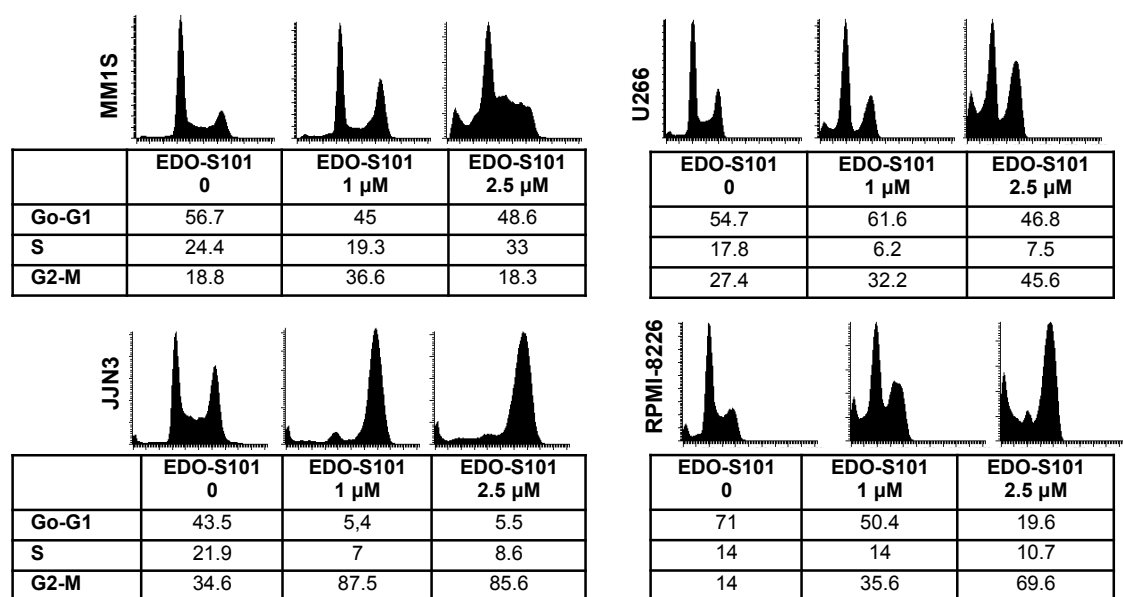
Figura 2. 11 Ensayo cometa en MM1S tras 48 horas de incubación con EDO-S101



4. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE EDO-S101 EN EL CICLO CELULAR Y EN LOS MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

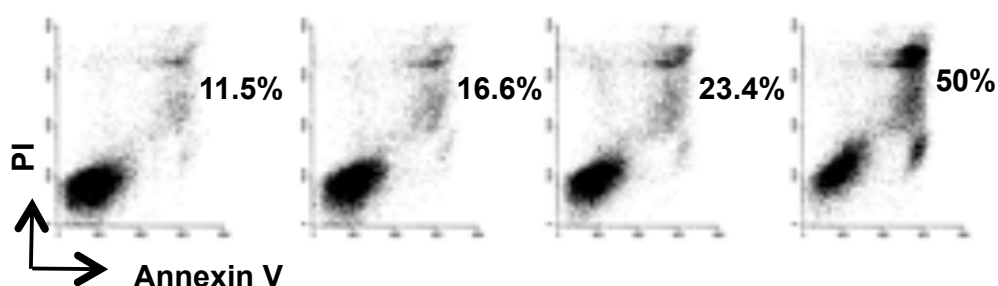
Dado el daño inducido por EDO-S101 sobre el ADN, se estudiaron posteriormente los posibles efectos que este evento producía sobre el perfil del ciclo celular y la apoptosis. El tratamiento con EDO-S101 resultó en una acumulación de células en las fases G₂-M del ciclo que fue independiente del estado mutacional de p53 de las líneas evaluadas, seguida de un aumento de células apoptóticas (fase sub-G₀), como se observa en la Figura 2. 12.

Figura 2. 12 Análisis del ciclo celular tras incubación durante 48 horas con EDO-S101 a las dosis indicadas



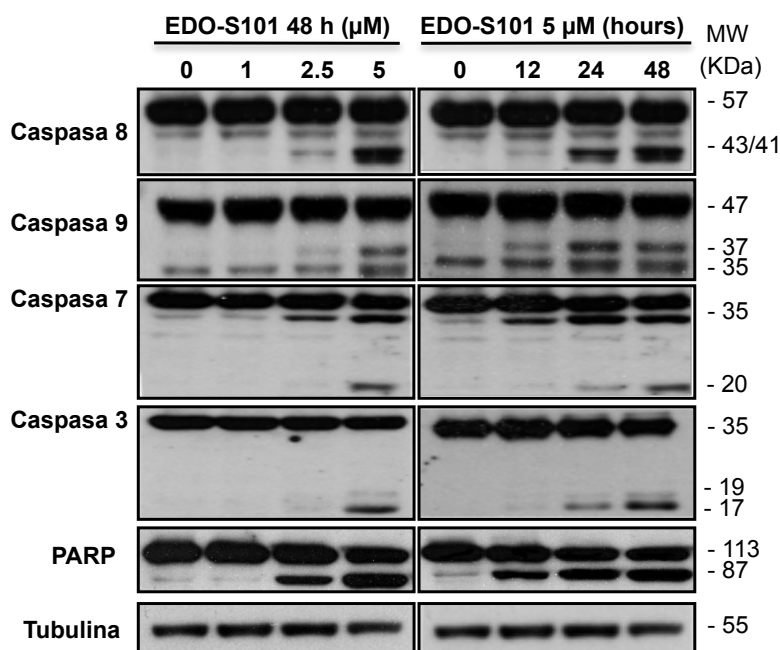
Esta inducción de apoptosis también se demostró mediante el marcaje de la línea celular MM1S con Anexina V tras incubación con EDO- S101 por 48 horas (Figura 2. 13).

Figura 2. 13 Análisis por citometría de flujo de la apoptosis inducida en MM1S tras incubación con EDO-S101 (0-1-2,5 y 5 μ M) durante 48 horas



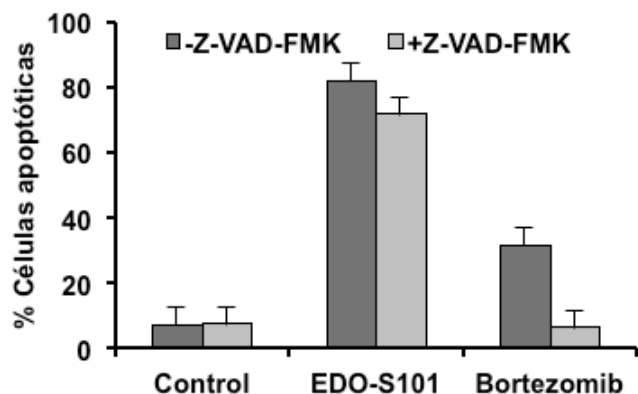
Para evaluar el mecanismo responsable de esta muerte desencadenada por EDO-S101 se analizaron las caspasas, proteínas implicadas en la señalización (caspasas iniciadoras) y ejecución (caspasas efectoras) de la muerte celular. Por un lado, se observó cómo las caspasas iniciadoras, tanto la caspasa 9 (vía mitocondrial) como caspasa 8 (vía extrínseca) se activaban tras 12 y 24 horas de incubación con el fármaco respectivamente. Además, se observó el procesamiento de las caspasas efectoras 3 y 7 tras 24 horas de incubación. Curiosamente, el procesamiento de PARP se detectó antes de la activación de las caspasas efectoras (tras 12 horas de tratamiento), lo que sugiere la implicación potencial de mecanismos apoptóticos independientes de caspasas.

Figura 2. 14 Inducción de caspasas y PARP tras incubación con EDO-S101



PARP es una proteína implicada en la fase final de la muerte celular mediante la fragmentación del ADN. Puede ser activada por las caspasas efectoras u obedecer a otras proteínas pro-apoptóticas independientes de caspasas. De hecho, la pre-incubación con el inhibidor pan-caspasa Z-VAD-FMK fue incapaz de inhibir la muerte inducida por EDO-S101 (Figura 2. 15), lo que sugiere la posible implicación de mecanismos independientes de caspasas en la muerte celular inducida por EDO-S101 en MM1S (Figura 2. 15). Como control positivo se utilizó bortezomib, un fármaco que induce muerte dependiente de caspasas en MM1S y en cuyo caso la pre-incubación con Z-VAD-FMK fue capaz de inhibir casi totalmente la apoptosis.

Figura 2. 15 Análisis por citometría de flujo de células en apoptosis tras 24 horas de incubación sin tratamiento (control), con EDO-S101 (10 μ M) y con bortezomib (2 nM), y a los que se les hizo un pre-tratamiento con o sin Z-VAD-FMK (50 μ M)



Atendiendo a la íntima relación existente entre la alteración del potencial de membrana mitocondrial y la muerte celular se analizaron las alteraciones inducidas por EDO-S10 en este orgánulo celular. Tras la activación de la vía intrínseca de la apoptosis o vía mitocondrial (iniciada por la caspasa 9) inducida por EDO-S101, se observó una disminución en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (Figura 2. 16), seguida de la consecuente translocación de AIF de la mitocondria al núcleo (Figura 2. 17).

Figura 2. 16 Disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en la línea MM1S, tras 48 horas de incubación con EDO-S101

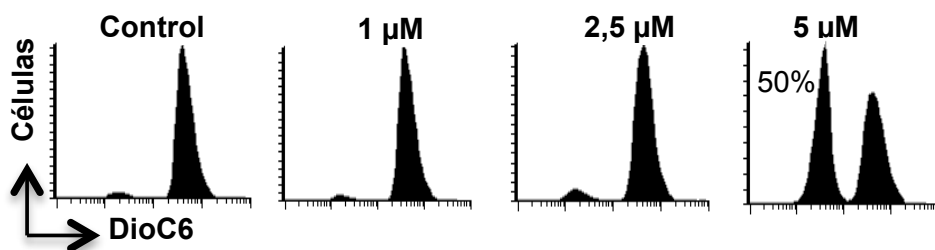
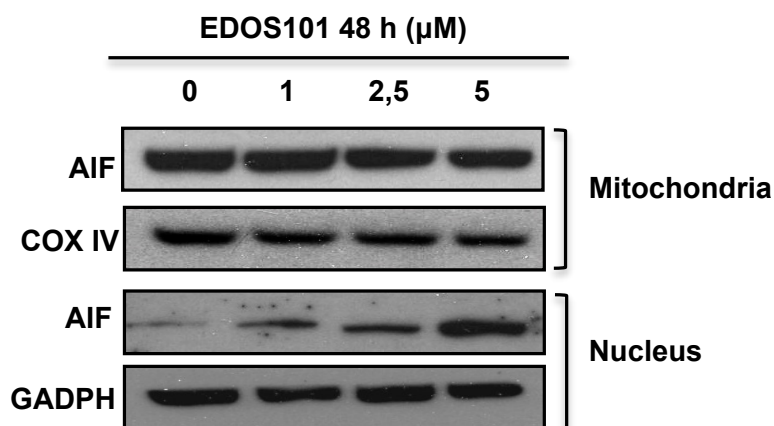
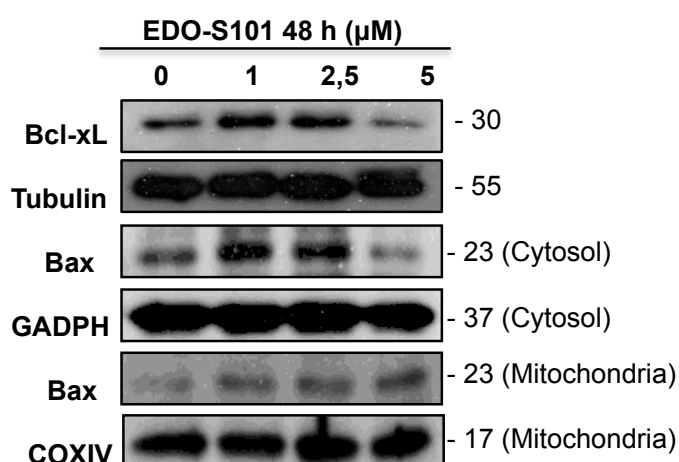


Figura 2. 17 Translocación de AIF desde la mitocondria al núcleo en la línea celular MM1S tras 48 horas de incubación con distintas dosis de EDO-S101



Otras proteínas que juegan un papel importante en la muerte celular son las pertenecientes a la familia de Bcl-2. A este respecto, se observó una ligera disminución de la proteína anti apoptótica Bcl-XL, así como la traslocación de la proteína Bax desde el citoplasma al núcleo celular (Figura 2. 18). Ambas proteínas se han relacionado también con los efectos previamente observados: la disminución del $\Delta\Psi_m$, la formación de poros en la membrana externa mitocondrial y la liberación de AIF desde la mitocondria.⁴⁶

Figura 2. 18 Análisis de la expresión de proteínas de la familia Bcl2 en MM1S, tras incubación con EDO-S101 48 horas



5. ANÁLISIS DE LA INHIBICIÓN DE LA REPARACIÓN DEL ADN MEDIANTE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA INDUCIDA POR EDO-S101

Recientemente se ha descrito que los inhibidores de deacetilasas de histonas, pueden inhibir la vía de reparación del ADN por recombinación homóloga (*homologous recombination*, HR) en MM.¹⁷⁸ Además, esta propiedad también ha sido demostrada para otros HDACi en cáncer de próstata¹⁷⁹ o cáncer de ovario.¹⁸⁰ Basándonos en estos trabajos, se exploró si la eficiencia reparadora del ADN por HR se veía afectada en líneas celulares de MM tras su incubación con EDO-S101. Para ello se utilizaron dos líneas celulares de MM, U266HR y JLN3HR, con una secuencia genética conocida, cromosómicamente integrada en su genoma y que expresan GFP (proteína verde fluorescente) cuando se produce reparación mediante HR.⁹⁰ En resumen, las células-HR se pre incubaron durante 24 horas con EDO-S101 a dosis bajas y sin el fármaco. Transcurridas 24 horas las células se transfectaron con endonucleasa *I-SceI* (capaz de inducir una rotura de doble cadena en un punto concreto del gen integrado) y con el plásmido pDsRed-N1 (emisor de fluorescencia roja), utilizado como control de transfección. Las células se incubaron durante 30 horas más con dosis bajas de EDO-S101 (sub-letales) o sin él, y los resultados se analizaron por citometría de flujo. Cuando las células eran capaces de reparar la ruptura endógena por HR, ésta daba lugar a la expresión de GFP funcional (fluorescencia verde). La eficiencia reparadora se calculó transcurridas esas 30 horas, como la razón entre las células GFP+ (verdes) y las células DsRed+ (rojas). Como se puede observar en la **Figura 2. 19**, las células tratadas con EDO-S101 presentaron una importante reducción en su capacidad reparadora (verdes) comparándolas con las células control (sin tratamiento con EDO-S101). La cuantificación de la eficiencia reparadora se presenta en la Figura 2.20. Se usó como control mirin, un inhibidor de Mre11-Rad50-Nbs1, complejo requerido para completar el proceso de reparación mediante HR.⁹³

Figura 2. 19 Células JJN3HR y U266HR pre tratadas o no con EDO-S101 durante 24 h, transfectadas con 5 μ g de *I-SceI* y 1 μ g de pDSRed2-N1, e incubadas durante 30 h más con o sin EDO-S101. Se analizaron por citometría de flujo células GFP+ y/o DsRojas+ (100.000 células en el caso de JJN3HR, y 200.000 en U266HR).

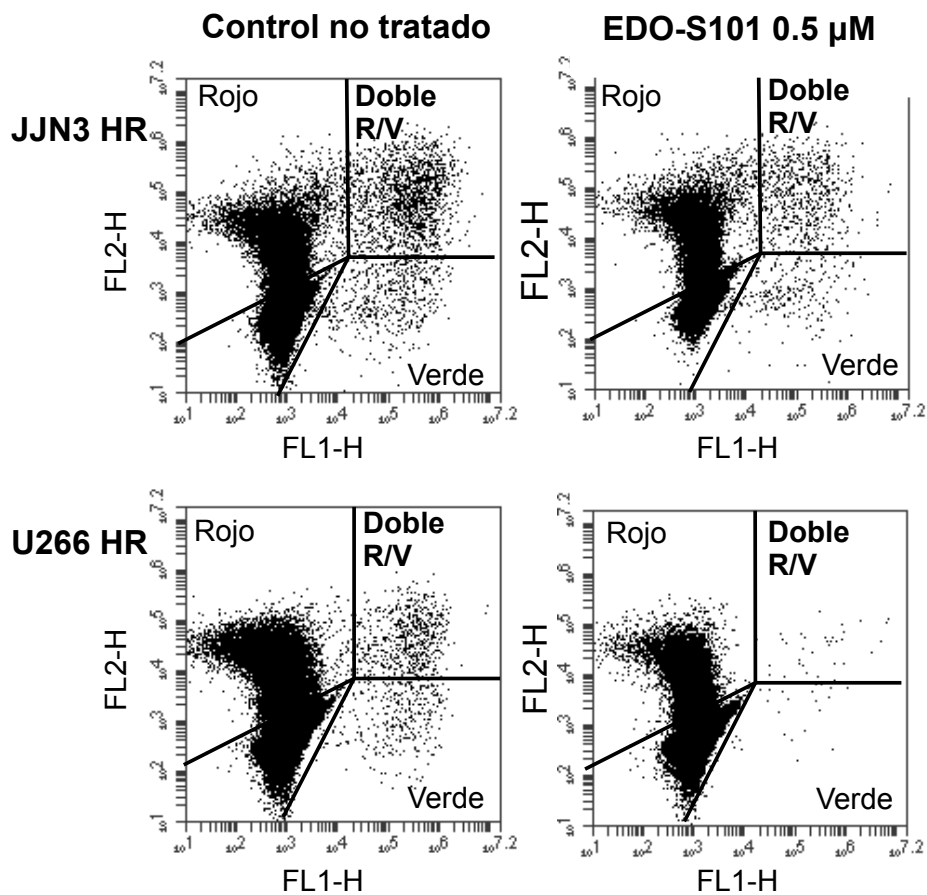
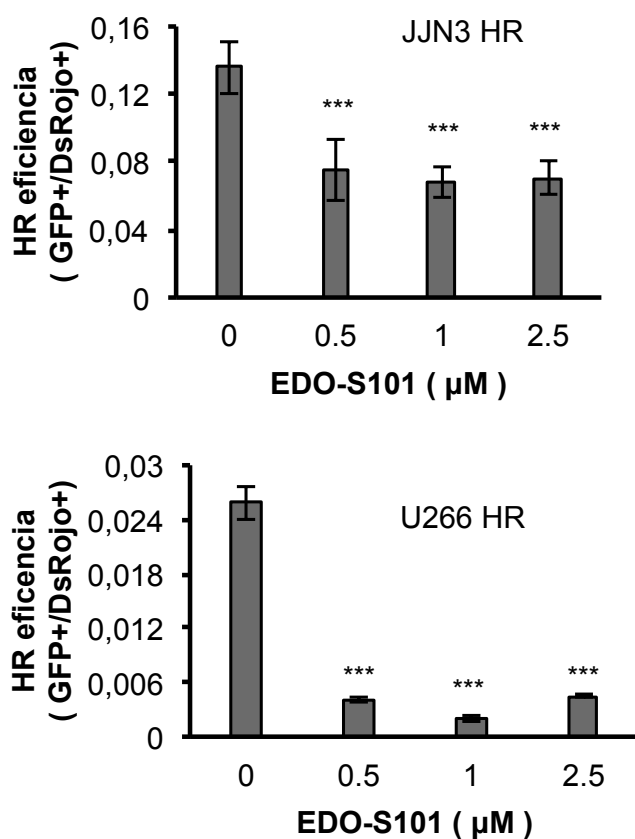


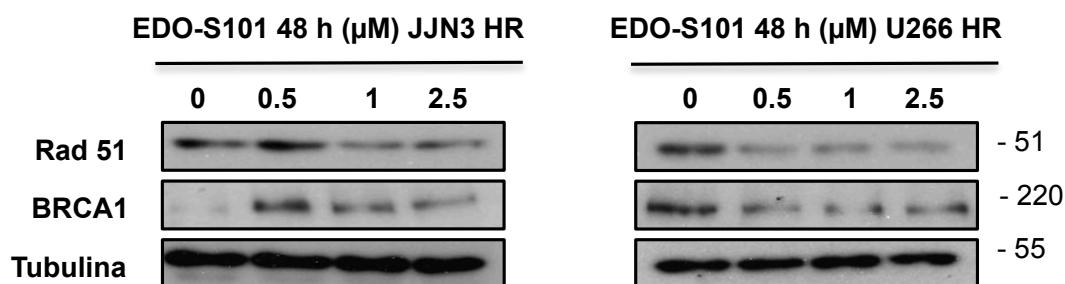
Figura 2. 20 EDO-S101 reduce la eficiencia reparadora por HR. Los datos se representan como medias de 3 experimentos independientes \pm SD (*, $p < 0.001$, comparando células tratadas con EDO-S101 con las no tratadas)**



Para investigar el mecanismo subyacente a esta deficiencia funcional en la vía de HR, se investigó el efecto de EDO-S101 sobre los niveles de algunas proteínas implicadas en la reparación de DSBs (roturas de doble cadena), tales como RAD51 y BRCA1. El tratamiento con el fármaco indujo una disminución en los niveles de RAD51 en ambas líneas celulares, U266HR y JLN3HR. Respecto a BRCA1, los resultados fueron más heterogéneos, ya que mientras dosis crecientes de EDO-S101 indujeron una disminución de la proteína en U266HR, esta variación no se observó en el caso de JLN3HR (Figura 2. 21). La disminución de las dos proteínas, RAD51 y BRCA1 en U266HR, podría estar relacionada con la menor eficiencia

reparadora por HR observada en el ensayo funcional en U266HR en comparación con JN3HR (Figura 2. 20).

Figura 2. 21 Proteínas de la vía de recombinación homóloga implicadas en la reparación de las roturas de doble cadena



Puesto que la radiación también induce roturas de doble cadena en el ADN y pone en marcha mecanismos de reparación, evaluamos el efecto de EDO-S101 en células de MM irradiadas. Las líneas celulares U266HR y JN3HR se pre-incubaron con dosis bajas de EDO-S101 durante 24 horas, se irradiaron con 2 Gy y se incubaron en presencia del fármaco durante 5 horas más. Transcurrido este tiempo se analizó por inmunohistoquímica el marcaje para pH2AX (marcador de DSBs) y para RAD51 (proteína reparadora de la vía HR). Se observó que el porcentaje de células con focos positivos para RAD51 y pH2AX (RAD51+ pH2AX+) era menor en las muestras tratadas con EDO-S101, tanto en U266HR como en JN3HR. Además, las células tratadas con EDO-S101 presentaban una distribución de la proteína RAD51 más difusa, con focos menos definidos y localizados no sólo en el núcleo sino incluso a nivel citoplasmático (Figura 2. 22, Figura 2. 23). Todo esto es indicativo de que EDO-S101 actúa como un HDACi, al inhibir el correcto reclutamiento de RAD51 a los sitios de daño sobre el ADN. Este nuevo agente terapéutico, EDO-S101 es capaz de actuar tanto como agente alquilante, induciendo daño sobre el ADN, y como HDACi inhibiendo su reparación.

Figura 2. 22 Marcaje inmunofluorescente para p-H2AX y RAD51 en JJN3HR 5 horas tras la irradiación con 2 Gy en células incubadas o no (control) con EDO-S101

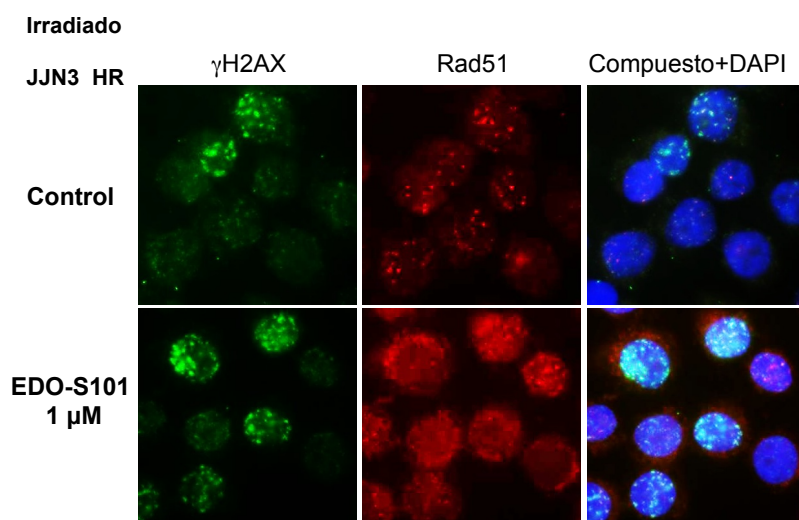
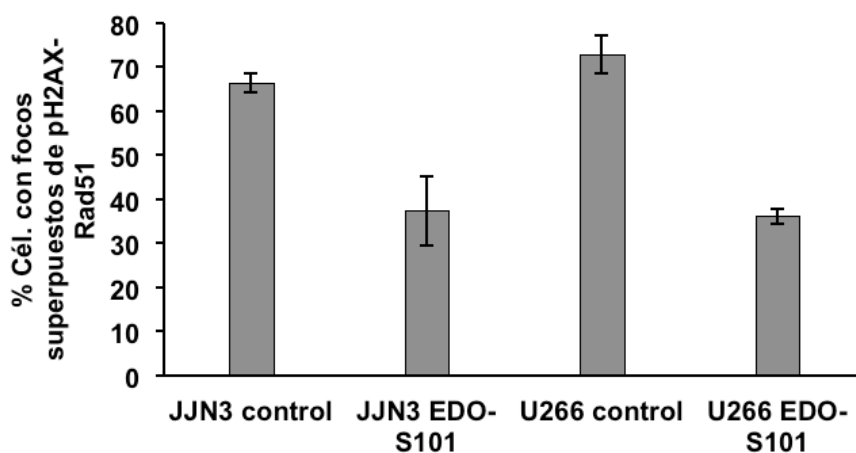


Figura 2. 23 Cuantificación de focos doblemente positivos para RAD51 y pH2AX (RAD51+ y pH2AX+) del experimento anterior en cada una de las condiciones indicadas



6. ESTUDIO DE LA EFICACIA *IN VIVO* DE EDO-S101 EN MODELOS MURINOS DE MM

La actividad *in vivo* de EDO-S101 se evaluó en dos estudios diferentes. En el primero, se emplearon ratones CB17-SCID con un xenotrasplante de plasmocitoma subcutáneo de células MM1S; estos ratones fueron aleatorizados a recibir tratamiento con el vehículo de EDO-S101 (ratones control), bendamustina, vorinostat, bendamustina + vorinostat o EDO-S101. Se llevó a cabo un experimento preliminar para definir la dosis máxima tolerada de cada droga, de forma que las dosis individuales de vorinostat y bendamustina fueron las correspondientes a la dosis máxima tolerada cuando los dos agentes eran utilizados en combinación. Así, los ratones se trataron durante 21 días ($n = 5$ /grupo) con vehículo (grupo control), bendamustina (15 mg / kg iv, una vez a la semana); vorinostat (100 mg / kg ip, cinco días por semana); bendamustina + vorinostat a las dosis indicadas, y EDO-S101 (60 mg / kg iv, una vez a la semana). Como se observa en la Figura 2. 24, EDO-S101 produjo una fuerte inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa a partir del día 7 ($p < 0,05$) comparado con el resto de tratamientos, excepto con vorinostat + bendamustina. Además, EDO-S101 prolongó significativamente la mediana de supervivencia en comparación con los grupos control, bendamustina y vorinostat en monoterapia ($p < 0,05$) y unos 24 días (76 vs 52) respecto a bendamustina + vorinostat ($p = 0,06$) (Figura 2. 25). En cuanto a la toxicidad, los ratones que recibieron EDO-S101 mostraron una pérdida de peso corporal de 10-20% (Figura 2. 26), que se recuperó espontáneamente en todos los ratones excepto en uno, que murió prematuramente en el día 23 de tratamiento (la curva de crecimiento tumoral se continuó ya que la muerte temprana no afectó a la mediana del grupo). En el grupo de ratones que recibieron la combinación de bendamustina + vorinostat, se produjo una muerte no relacionada con el tratamiento en el día 8, y dos ratones más murieron de forma prematura (días 33 y 37) con necrosis de la cola y ulceración del tumor.

Figura 2. 24 Evolución del volumen tumoral en el modelo murino de plasmocitoma subcutáneo

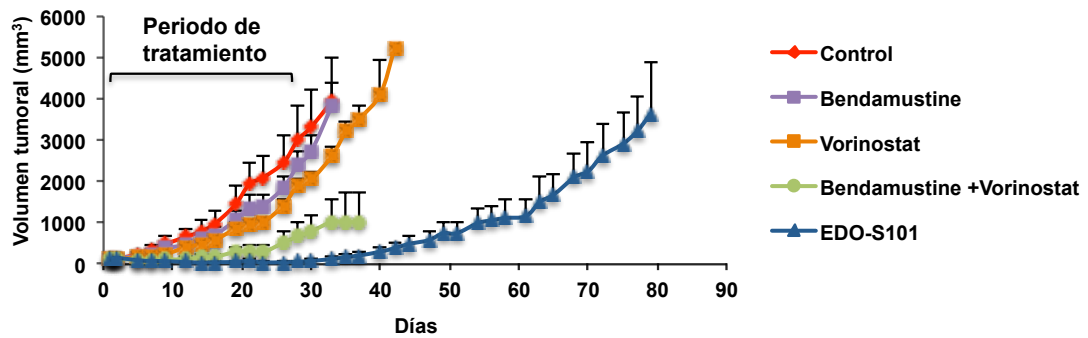


Figura 2. 25 Curvas de supervivencia de los distintos grupos de tratamiento mostrados en la gráfica anterior (modelo de plasmocitoma subcutáneo)

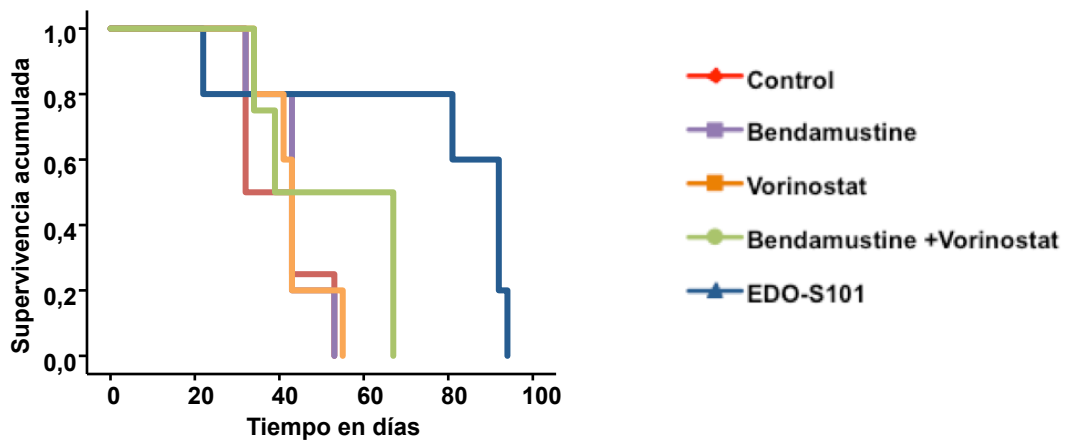
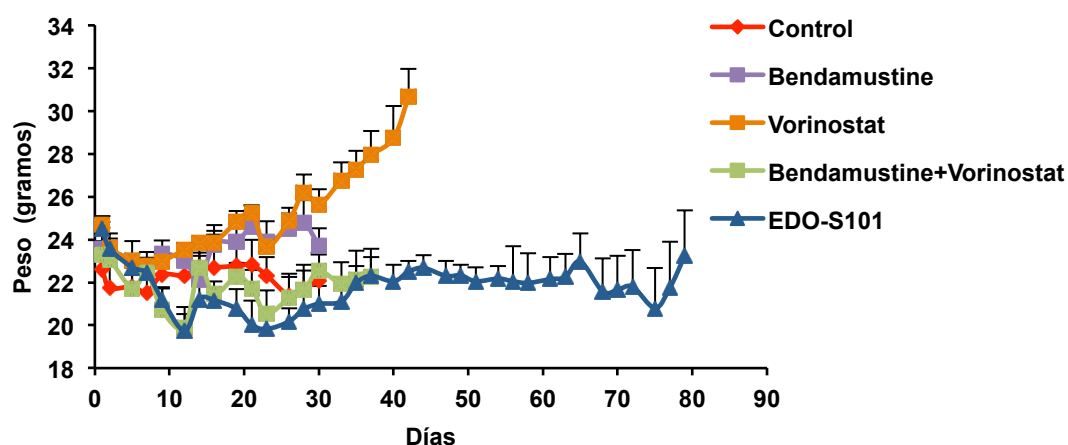
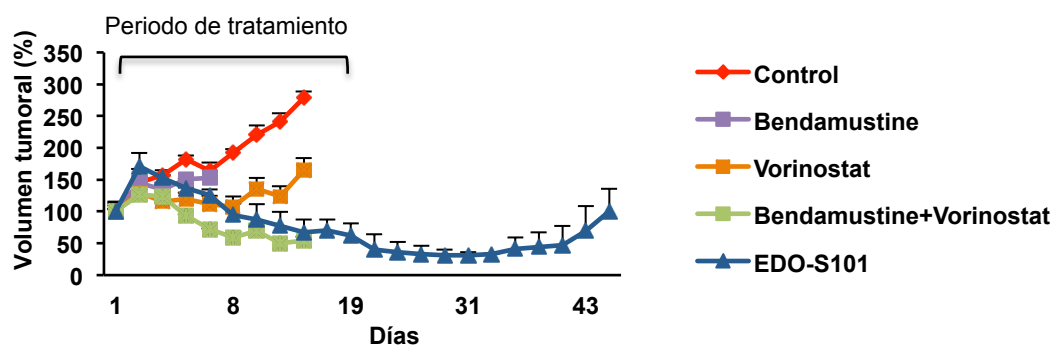


Figura 2. 26. Evolución del peso de los ratones



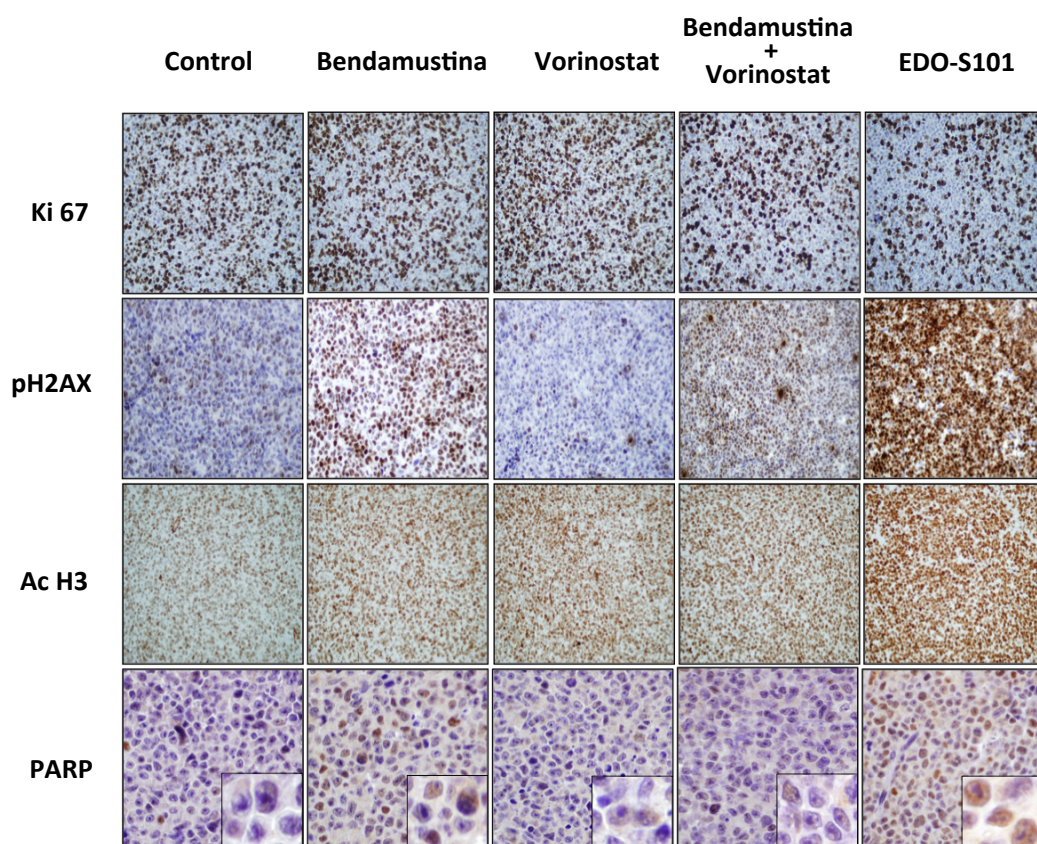
El segundo estudio *in vivo* se realizó también en ratones CB17-SCID, pero con tumores de mayor tamaño. El volumen tumoral promedio al inicio del tratamiento fue de 4.000 mm³ y los ratones se randomizaron a los mismos grupos de tratamiento, aunque en este caso había 4 ratones por grupo. Dos ratones de cada grupo se sacrificaron de forma precoz, antes de finalizar el tratamiento de 21 días, para realizar estudios inmunohistoquímicos en el tumor y evaluar el mecanismo de acción de los distintos fármacos *in vivo*. Los otros dos ratones de cada grupo recibieron el tratamiento completo durante 21 días, evaluándose el volumen tumoral y peso de los ratones. Como se puede observar en la Figura 2. 27, EDO-S101 fue capaz de reducir el tamaño de estos tumores a pesar de su gran volumen inicial. En este segundo modelo, aunque la combinación de bendamustina y vorinostat también fue capaz de controlar los tumores grandes, se observó una toxicidad excesiva en los ratones tratados con ambos fármacos a la vez. Por razones éticas en este experimento se empleó un escaso número de ratones por grupo, por lo que no fue posible analizar la supervivencia. De manera descriptiva, sin embargo, podemos decir que los ratones en el grupo tratado con EDO-S101 fueron sacrificados el día 46 y 53 debido a la progresión del tumor en comparación con los días 16 y 35 para los ratones tratados con la combinación (por toxicidad y progresión, respectivamente).

Figura 2. 27. Evolución del volumen tumoral de plasmocitomas subcutáneos grandes en un modelo murino.



En los estudios inmunohistoquímicos se observó un aumento importante del marcaje para la histona H3 acetilada y para H2AX fosforilado en los tumores de ratones tratados con EDO-S101. El incremento fue superior al observado en los tumores de ratones tratados con bendamustina o vorinostat en monoterapia e incluso con respecto a los tratados con la combinación. Por otro lado, EDO-S101 también indujo una mayor reducción del marcaje para Ki67 como indicativo del índice proliferativo celular en comparación con cualquiera de los otros grupos. Los grupos presentaron menos diferencias respecto a PARPc (Figura 2. 28). Estos datos apoyan la acción anti-proliferativa y el efecto pro-apoptótico de la molécula EDO-S101.

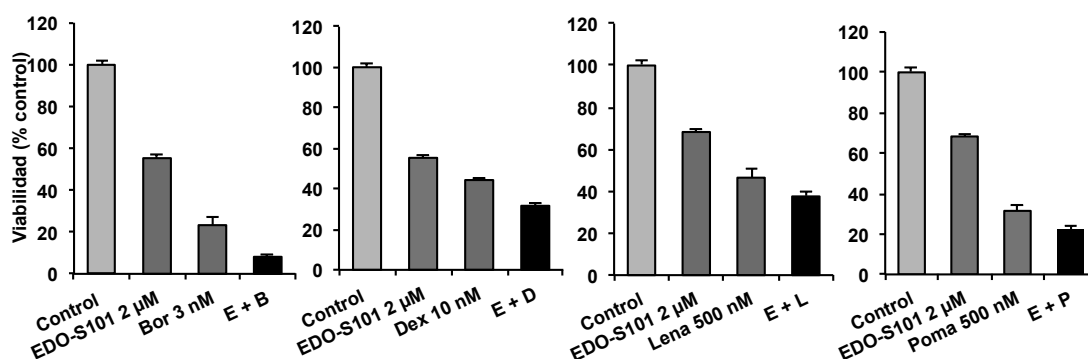
Figura 2. 28 Marcaje inmunohistoquímico en plasmocitomas de distintas proteínas implicadas en el mecanismo de acción de EDO-S101 *in vivo*



7. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE EDO-S101 EN COMBINACIÓN CON OTROS FÁRMACOS CON EFECTO ANTI-MIELOMA

Con el objetivo de evaluar la eficacia de EDO-S101 en combinación con otros tratamientos utilizados en la clínica habitual para tratar el MM, se trataron células MM1S con concentraciones subóptimas de EDO-S101 junto con dexametasona, bortezomib, lenalidomida o pomalidomida. EDO-S101 potenció la actividad de todos los agentes con índices de combinación (IC) en el rango aditivo / sinérgico según las concentraciones utilizadas: bortezomib (IC: 0.6); dexametasona (IC 0.7); lenalidomida (IC 0.7) y pomalidomida (IC 0.4). Ejemplos representativos de cada doble combinación se muestran en la Figura 2. 29.

Figura 2. 29 EDO-S101 en combinación con otros fármacos utilizados en MM



A la vista de estos resultados, se consideró que la combinación de EDO-S101 con bortezomib y dexametasona era particularmente prometedora, ya que los inhibidores del proteasoma han sido los agentes más frecuentemente combinados con agentes alquilantes en el ámbito clínico.^{181,182} Por ello, se profundizó en esta combinación evaluando también su eficacia *in vivo*. Se utilizaron ratones CB-17 SCID con un xenoinjerto de plasmocitoma subcutáneo de células MM1S, que fueron randomizados una vez que el tumor era palpable para recibir tratamiento con vehículo (grupo control), bortezomib, EDO-S101 y EDO-S101 + bortezomib. Como se muestra en la Figura 2. 30 la combinación EDO-S101 + bortezomib prolongó la supervivencia (72 días) en comparación con bortezomib o EDO-S101 en monoterapia (39 y 44 días respectivamente; Log Rank, $p < 0.001$, Figura 2. 31). Respecto a la toxicidad, los ratones tratados con EDO-S101 + bortezomib mostraron una pérdida de peso moderada (<20%), que se recuperó de forma espontánea una vez finalizadas las 3 semanas programadas del tratamiento.

Figura 2. 30 Análisis de eficacia de EDO-S101 en combinación con bortezomib en un modelo murino de plasmocitoma subcutáneo de células MM1S

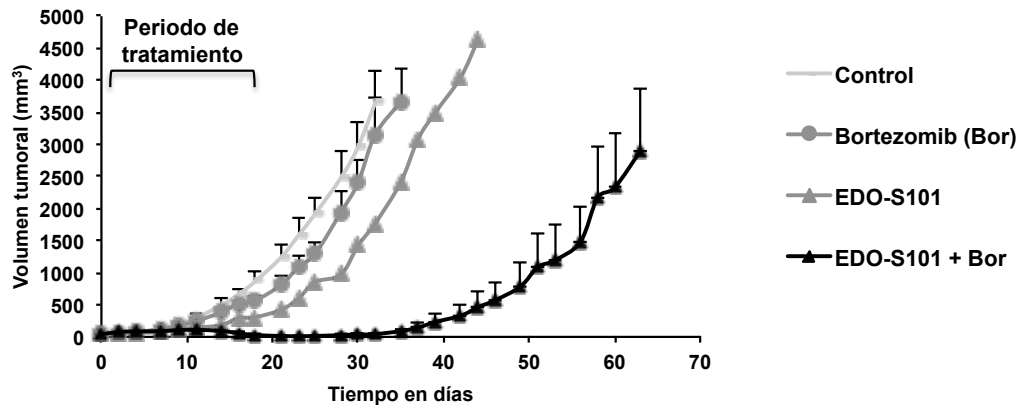
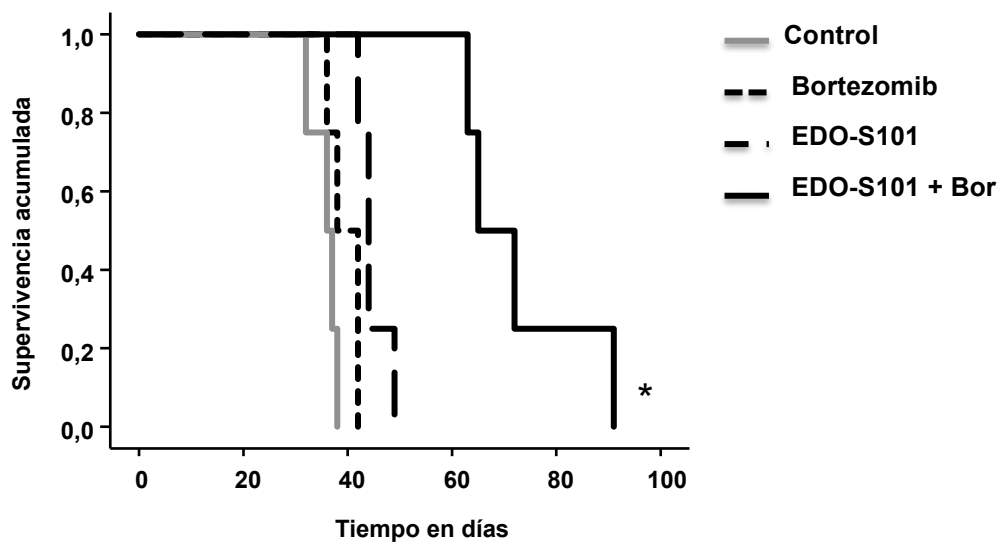


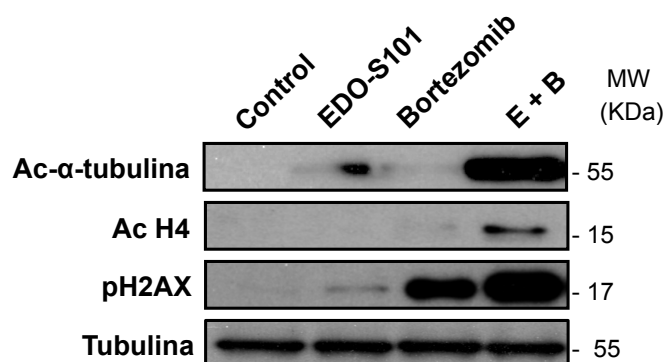
Figura 2. 31 Curvas de supervivencia del experimento anterior, con prolongación significativa de la supervivencia con el tratamiento EDO-S101 + bortezomib



Además se evaluó el mecanismo de acción de EDO-S101 + bortezomib *in vitro*, observándose que la combinación resultaba en un

aumento de la acetilación y del daño inducido sobre el ADN en comparación con los respectivos agentes en monoterapia (Figura 2. 32).

Figura 2. 32 Análisis del mecanismo de acción de EDO-S101 y bortezomib en combinación



8. ANÁLISIS DE EFICACIA DE EDO-S101 EN MM. DISCUSIÓN.

Estudios preclínicos previos ya habían demostrado la sinergia de la combinación de los inhibidores de HDAC y los alquilantes en MM^{156,183} y en otros SLP-B.¹⁸⁴ Sin embargo, la toxicidad puede ser relevante en el entorno clínico, y de hecho, la elevada toxicidad hematológica observada con la combinación melfalán y panobinostat en MM, impidió la constatación clínica de eficacia en este ensayo clínico en particular.¹⁸⁵ Una de las hipótesis que promovió el diseño EDO-S101 como nueva molécula de fusión, fue que la administración combinada de ambos agentes en el mismo compuesto, aumentaría la eficacia de ambos mecanismos, disminuiría la toxicidad y facilitaría su administración.

En nuestros estudios, EDO-S101 mostró eficacia en todas las líneas celulares de MM estudiadas (mediana IC50 = 3,1 μM) y también en las células plasmáticas de pacientes previamente no tratados y aquellos refractarios (mediana IC50 = 5 μM), independientemente del estado

mutacional de p53. Curiosamente, EDO-S101 fue igualmente eficaz en las líneas celulares que presentaban resistencia farmacológica a tratamientos anti-mieloma convencionales, tales como dexametasona (MM1R), y en particular el melfalán (RPMI-LR5, U266-LR7), lo que indica que este compuesto es, por lo menos en el entorno *in vitro*, más potente que otros alquilantes como el melfalán, y podría ser utilizado para vencer la resistencia a esta droga. Los datos *in vivo* también apoyan la eficacia de EDO-S101, tanto retrasando el crecimiento tumoral de plasmocitomas pequeños como reduciendo el tamaño de los grandes. Por otra parte, y atendiendo a otros estudios de EDO-S101 *in vivo*, cabe destacar la alta tasa de respuesta inducida por EDO-S101 en el modelo de MM de ratón, Vk*MYC,¹⁸⁶ diseñado por ingeniería genética y reconocido como un modelo predictor de eficacia de drogas y respuesta clínica en MM.¹⁸⁷ En ese estudio, realizado en colaboración con la Clínica Mayo y que se ha incluido en la publicación de este trabajo de investigación, la respuesta a EDO-S101 se mantuvo durante más de 3 meses en ratones que recibieron sólo 2 dosis del fármaco. Además, EDO-S101 fue el único agente con actividad anti-mieloma en monoterapia identificado en el modelo trasplantado multiresistente de MM en recaída/refractario Vk12653.¹⁸⁸ Atendiendo al mecanismo de acción, la hipótesis para el desarrollo de EDO-S101 se basó en que la actividad inhibidora de deacetilasa de histonas (vorinostat) abriría la cromatina, lo que facilitaría que el agente alquilante, bendamustina, ejerciera daño sobre el ADN. Nuestros estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran esta actividad alquilante con un aumento en la fosforilación de H2AX y en la fragmentación del ADN. En los experimentos *in vivo*, aunque la combinación por separado de vorinostat y bendamustina fue también sinérgica, los niveles de pH2AX fueron más altos en los plasmocitomas de ratones tratados con EDO-S101, entendiéndose que EDO-S101 ejercía más daño sobre el ADN que las dos drogas administradas de forma independiente. De cara a profundizar en el mecanismo de acción de EDO-S101, se estudiaron proteínas implicadas en la respuesta al daño ejercido sobre el ADN y se observó que ATM podría ser la proteína iniciadora de la cascada de señalización, con un aumento precoz en sus niveles de fosforilación y una posterior disminución. Esta activación limitada en el tiempo de ATM sería suficiente para inducir la fosforilación y

consecuente activación de las proteínas efectoras de la respuesta a daño¹⁸⁹: Chk2¹⁹⁰ e incluso Chk1¹⁹¹, ya que no se pudo demostrar la activación de ATR, la otra quinasa que participa en la fosforilación de Chk1.

El efecto pan-inhibidor de deacetilasas de histonas de EDO- S101 se demostró por la acetilación de las histonas 3 y 4 (consecuencia de la inhibición de las desacetilasas de clase I DAC1 y DAC2¹⁹²) y también por la acetilación de α -tubulina (sustrato de DAC6¹⁰⁵, deacetilasa de histonas de clase II). Además, también ha quedado demostrado que EDO-S101 puede inhibir la reparación de DSBs por HR, lo que concuerda con trabajos previos de otros grupos que han demostrado una reducción en la actividad HR tras el tratamiento con inhibidores de HDAC. En esta línea, se ha demostrado recientemente el papel de la HDAC8 en la reparación de los DSBs, ya que esta proteína co-localiza con RAD51 en los lugares de daño del ADN inducidos por radiación, y la inhibición de la HDAC8 se ha correlacionado con una disminución en la actividad del promotor de RAD51.¹⁰⁴ Estos datos podrían explicar el defecto en el reclutamiento de RAD51 a los sitios de daño en células pre-tratadas con EDO-S101 e irradiadas posteriormente.

Un punto importante para cualquier nuevo agente terapéutico es la capacidad de sinergia con otras drogas con efecto anti-mieloma. En este sentido, EDO-S101 mostró sinergia *in vitro* con varios agentes, tales como dexametasona, bortezomib e IMiDs. Son numerosos los estudios que han demostrado la sinergia entre agentes alquilantes y bortezomib^{181,182,193,194} y de bortezomib con HDACi,^{195,196} tanto en la pre-clínica como en la clínica. Atendiendo a la sinergia observada entre EDO-S101 y bortezomib existen dos premisas que podrían explicarla; la primera la potenciación por parte de bortezomib del daño inducido sobre el ADN, y la segunda la inhibición simultánea, por un lado, del proteasoma (provocada por el bortezomib) y la inhibición del agrosoma inducida por EDO-S101 y que se evidencia por la hiper-acetilación de la α -tubulina.¹⁰⁶ Esta circunstancia conllevaría la acumulación de gran cantidad de proteínas mal plegadas,¹⁰⁷ que contribuirían a la muerte celular.

En resumen, nuestros resultados demuestran la eficacia anti- mieloma *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, de EDO- S101 a través de su actividad inhibidora de

HDAC y la actividad alquilante. El mecanismo de acción particular de EDO-S101, con la participación de diferentes vías simultáneas, apoya el inicio de los estudios clínicos en pacientes con MM, tanto en monoterapia como en combinación con bortezomib.

CAPÍTULO III. ESTUDIO PRECLÍNICO

DE LA EFICACIA DE EDO-S101 EN

MONOTERAPIA Y EN COMBINACIÓN

EN LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA

AGUDA

1. ANÁLISIS DE LA EFICACIA DE EDO-S101 EN LMA

El cribado inicial mediante ensayo colorimétrico MTT demostró la actividad citotóxica de EDO-S101 en líneas celulares de LMA con distinto perfil citogenético y pertenecientes a diferentes subtipos morfológicos (Figura 3. 1). Para los estudios *in vitro* se utilizó el tiempo de 48 horas, ya que a este tiempo EDO-S101 era más eficaz que a 24 horas, y con eficacia similar a la de 72 horas (Capítulo I). Las líneas celulares utilizadas fueron KG1 y HEL, ambas establecidas a partir de células de pacientes con diagnóstico de leucemia eritroide aguda y que presentan fusión de FGFR1 y mutación de Jak2 respectivamente; HL60, establecida a partir de una muestra de leucemia aguda con maduración y que expresa c-Myc amplificado y MV4-11 establecida a partir de una leucemia monocítica aguda con t (4;11) y duplicación en tándem de FLT3.

Figura 3. 1 Análisis de eficacia de EDO-S101 en líneas celulares de LMA tras 48 horas de incubación

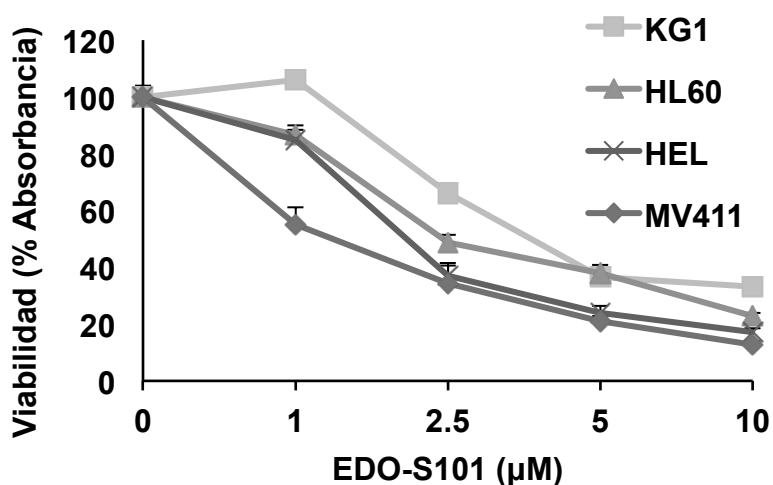
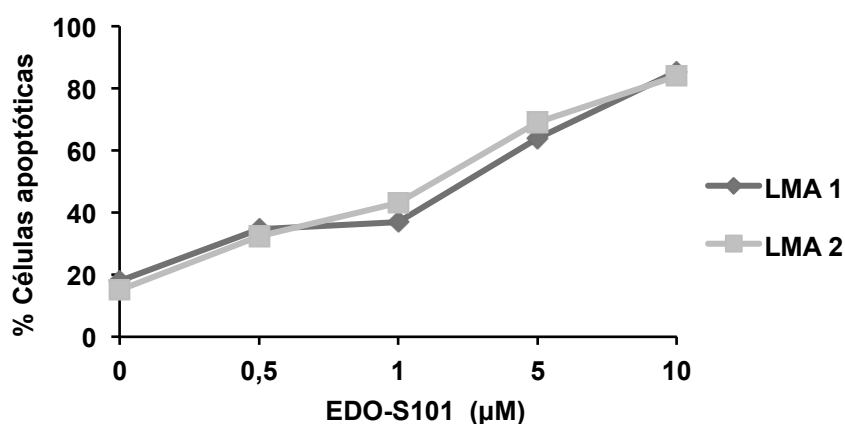


Tabla 3. 1 IC50 a 48 horas de EDO-S101 en varias líneas celulares de LMA

	IC50 (µM)
KG1	3,71
HL60	2,55
HEL	1,83
MV411	1,23

Para comprobar la eficacia *ex vivo* de EDO-S101 en LMA se utilizaron células de MO de dos pacientes con diagnóstico de LMA no promielocítica (Figura 3. 2). Atendiendo al perfil inmunofenotípico, la muestra LMA1 presentaba 2 poblaciones blásticas, las dos con expresión de CD33, una CD34 negativa y otra CD34 positiva. La muestra LMA2 presentaba una población blástica con expresión de CD33, CD117 y CD45 débil, y CD34 y CD64 negativos.

Figura 3. 2 Análisis de apoptosis *ex vivo* en muestras de MO de pacientes con LMA tras 24 horas de incubación con EDO-S101



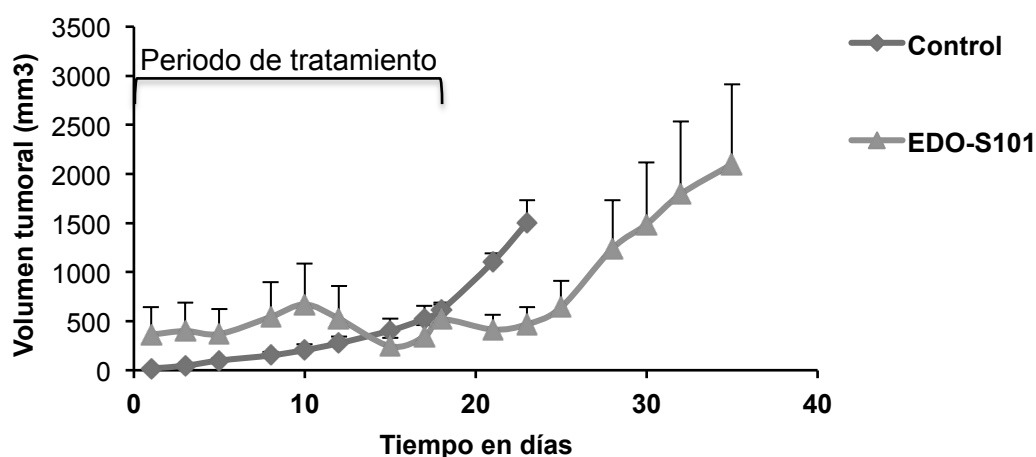
En este caso, no se profundizó en los mecanismos de actuación del fármaco, ya que esto se había hecho de forma detallada en el capítulo de MM

2. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA *IN VIVO* DE EDO-S101 EN UN MODELO MURINO DE LMA

Para realizar este estudio se inyectaron de forma subcutánea 3×10^6 células de la línea celular HEL en el flanco derecho de ratones CB17-SCID. Cuando los tumores fueron palpables se randomizaron al grupo de tratamiento control (que recibió el vehículo) y EDO-S101 (iv, 60 mg/kg/semana), durante 3 semanas. Durante el tratamiento y posteriormente se llevó a cabo la monitorización del volumen tumoral, peso de los ratones y perfil de toxicidad. Se utilizó el mismo esquema terapéutico y dosis que en el estudio *in vivo* de plasmocitoma subcutáneo.

Los ratones recibieron el fármaco intravenoso (iv) los días 1, 8 y 18. Aunque inicialmente EDO-S101 consiguió reducir el tamaño tumoral, una vez finalizado el tratamiento en el día 18, el tumor de los ratones tratados con EDO-S101 presentó un rápido crecimiento, y únicamente se observaron diferencias significativas de EDO-S101 respecto al control en el volumen tumoral en los 3 días posteriores al final del tratamiento (*T student*; $p= 0,02$). La curva de supervivencia tampoco mostró que EDO-S101 fuera superior al control de forma significativa (Log Rank test; $p > 0,05$).

Figura 3. 3 Modelo murino de LMA



Puesto que el estudio *in vivo* de EDO-S101 no mostró diferencias significativas de eficacia en comparación con el control a las dosis y con el esquema utilizado, se decidió no proseguir los estudios de este fármaco en monoterapia en LMA.

3. ANÁLISIS DE LA EFICACIA DE EDO-S101 EN COMBINACIÓN CON OTROS FÁRMACOS CON EFECTO ANTI-LEUCEMIA

Por último, se realizaron estudios de combinación *in vitro*, de EDO-S101 y agentes con conocido efecto anti-leucemia, para evaluar si existía efecto sinérgico entre ellos. Se utilizaron las líneas celulares HEL y HL60 a tiempos de 24 horas, siendo los resultados en ambas líneas similares.

EDO-S101 se combinó con citarabina (Ara-C), un agente antimetabolito que interfiere en la síntesis del ADN y que es utilizado en el esquema clásico de tratamiento de la LMA. Los resultados en la línea HEL se muestran en la Figura 3. 4 y Tabla 3. 2; y en la línea HL60 en la Figura 3. 5 y Tabla 3. 3.

Figura 3. 4 Eficacia de EDO-S101 en combinación con citarabina en la línea celular HEL tras 24 horas de incubación

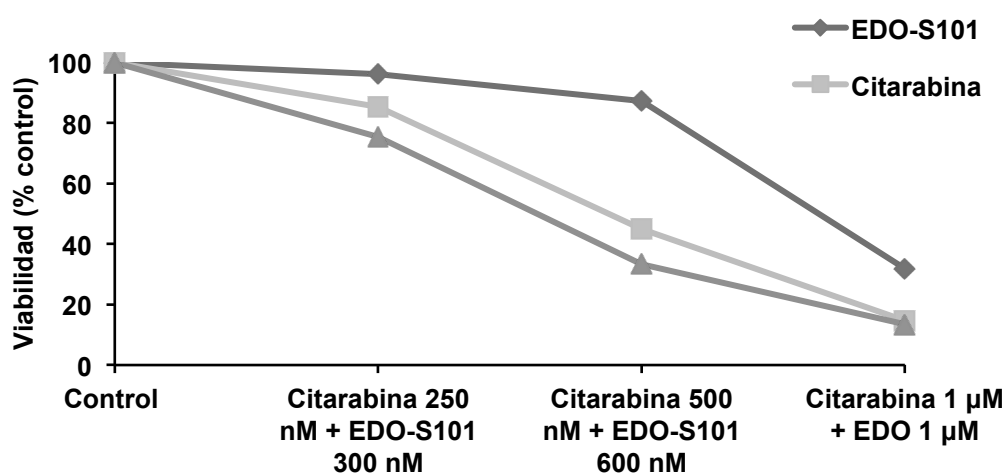


Tabla 3. 2 Índices de combinación de citarabina y EDO-S101 en la línea celular HEL

EDO-S101	Citarabina	Fa	CI
(nM)	(nM)		
300	250	0.246748	1.240
600	500	0.66748	1.253
1200	1000	0.865041	1.619

Figura 3. 5 Eficacia de la combinación EDO-S101 y citarabina en la línea celular HL60 tras 24 horas de incubación

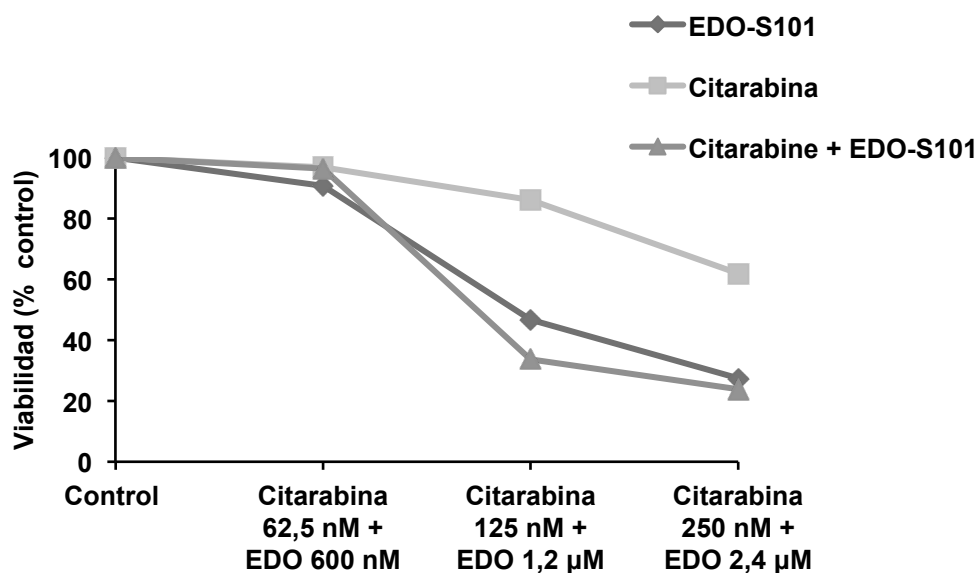


Tabla 3. 3 Índices de combinación de EDO-S101 y citarabina en la línea celular HL60

EDO-S101	Citarabina	Fa	CI
(nM)	(nM)		
600	62,5	0.0349776	2.709
1200	125	0.664126	0.928
2400	250	0.761435	1.503

También se evaluó la combinación de EDO-S101 con 5-azacitidina, en la línea HEL(Figura 3. 6, Tabla 3. 4) y en la línea HL60 (Figura 3. 7). La 5-azacitidina es un nucleósido pirimidínico análogo de la citidina, que ejerce sus efectos antineoplásicos mediante la hipometilación del ADN y mediante citotoxicidad directa sobre las células hematopoyéticas anormales de la médula ósea. Es utilizada en síndromes mielodisplásicos de alto riesgo y en pacientes con LMA no tributarios de terapias agresivas.

Figura 3. 6 Eficacia de EDO-S101 en combinación con 5-azacitidina en la línea celular HEL tras 24 horas de incubación

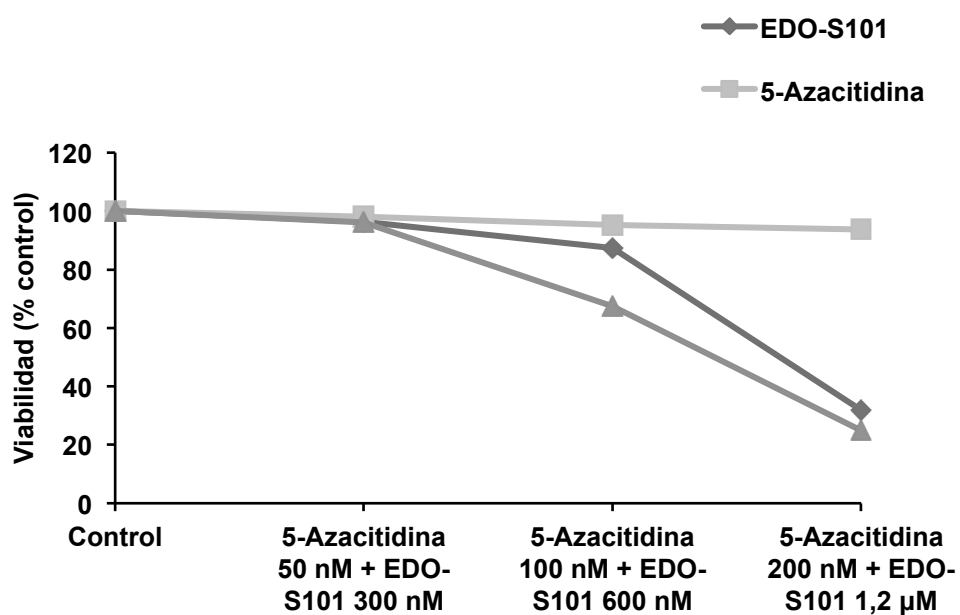
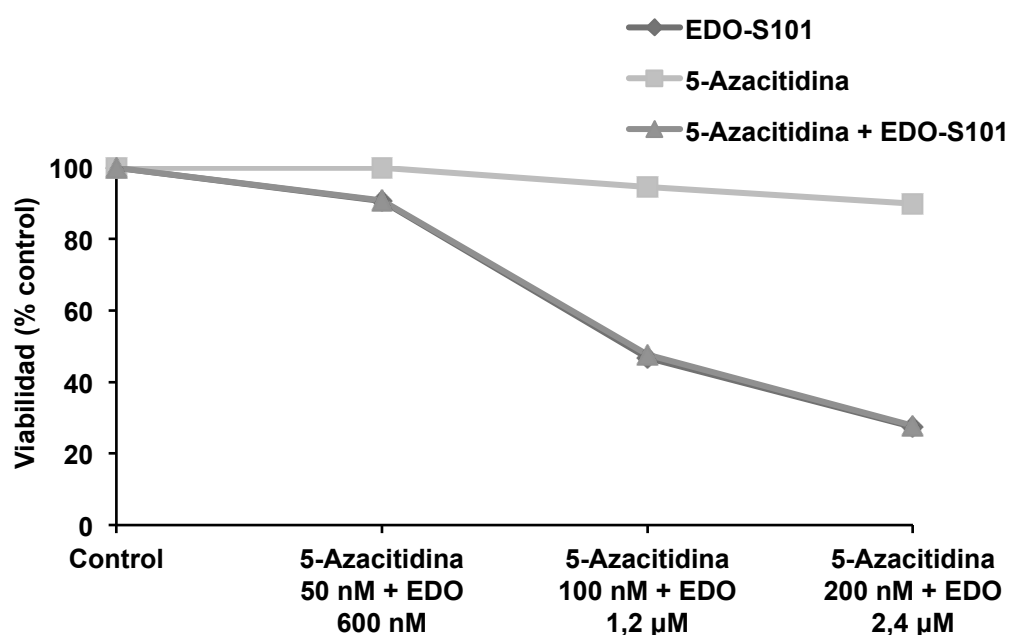


Tabla 3. 4 Índices de combinación de EDO-S101 y 5-azacitidina en la línea celular HEL

EDO-S101	5-Aza	Fa	CI
(nM)	(nM)		
300	50	0.0398175	1.394
600	100	0.325591	0.835
1200	200	0.750726	0.836

Figura 3. 7 Eficacia de la combinación EDO-S101 y 5-azacitidina en la línea celular HL60 tras 24 horas de incubación



Finalmente se evaluó también la combinación de EDO-S101 con el análogo de purinas, fludarabina, tanto en la línea HEL (Figura 3.8; tabla 3. 5) como en la HL60 (Figura 3. 9, Tabla 3. 6). La fludarabina se utiliza en esquemas terapéuticos de leucemia mieloblástica refractarias o en recaída

(esquema FLAG-IDA¹⁹⁷) y también como esquema alternativo de primera línea en pacientes mayores de 65 años o no tributarios de terapias agresivas (esquema FLUGA).¹⁹⁸

Figura 3. 8 Eficacia de EDO-S101 en combinación con fludarabina en la línea celular HEL tras 24 horas de incubación

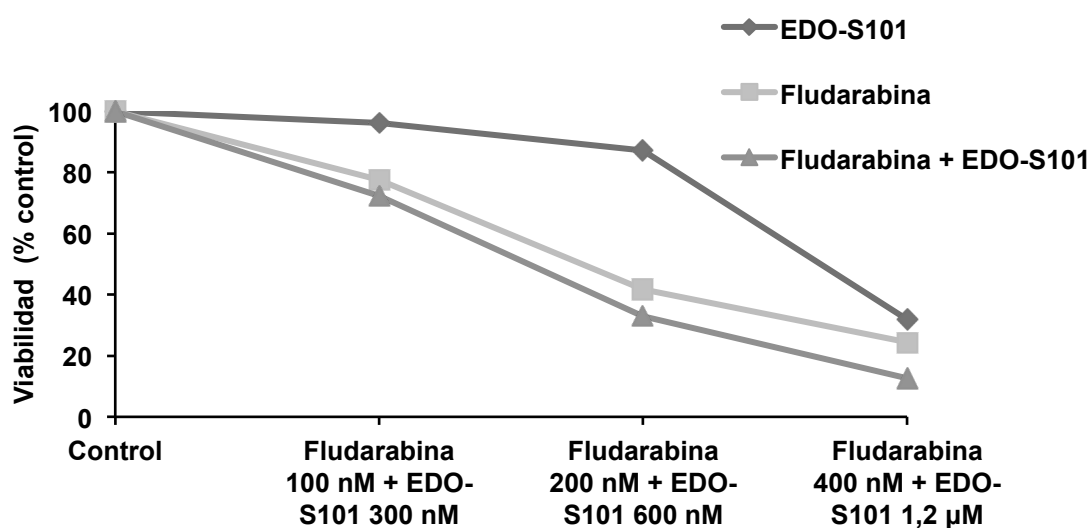


Tabla 3. 5 Índices de combinación de EDO-S101 y fludarabina en la línea celular HEL

EDO-S101 (nM)	Fludarabina (nM)	Fa	CI
300	100	0.277642	1.333
600	200	0.670325	1.159
1200	400	0.873577	1.288

Figura 3. 9 Eficacia de la combinación EDO-S101 y fludarabina en la línea celular HL60 tras 24 horas de incubación

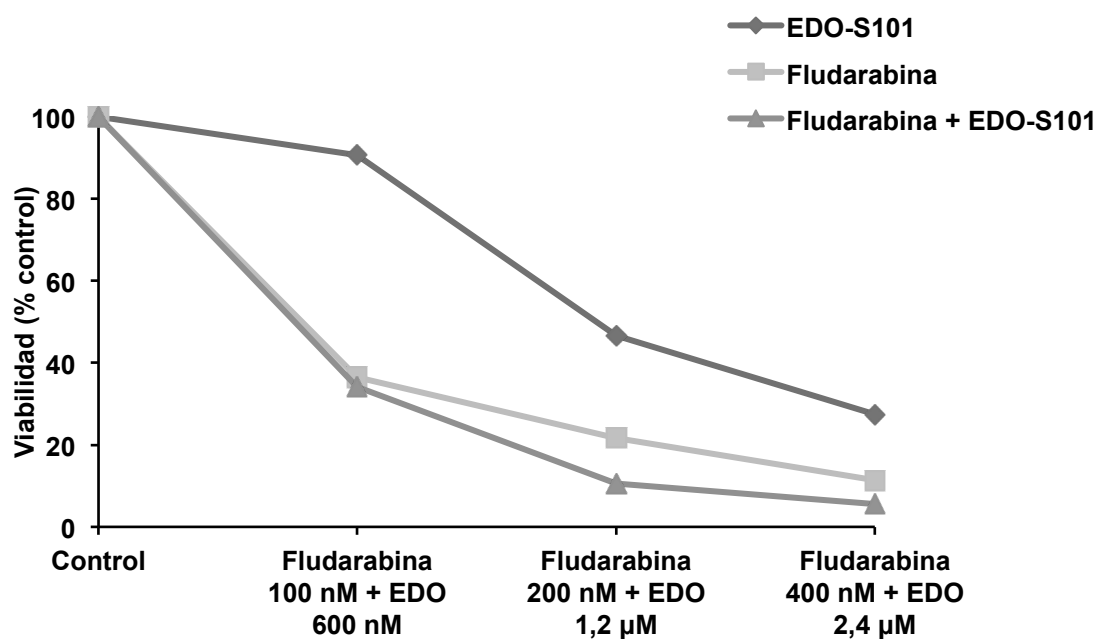


Tabla 3. 6 Índices de combinación de EDO-S101 y fludarabina en HL60

EDO-S101 (nM)	Fludarabina (nM)	Fa	CI
100	100	0.658744	1.224
1200	200	0.893722	0.803
2400	400	0.944843	0.981

Puesto que ninguna de las combinaciones estudiadas presentó un índice de combinación suficientemente sinérgico como para continuar el estudio en esa línea, se concluyó que con los fármacos y dosis utilizadas *in vitro* EDO-S101 no resultaban eficaz en combinación en las líneas celulares HEL y HL60.

4. ANÁLISIS DE LA EFICACIA DE EDO-S101 EN LMA.

DISCUSIÓN.

Desde hace 40 años el esquema clásico de tratamiento de la leucemia mieloblástica aguda no ha sufrido apenas cambios. Una serie de ensayos establecieron entonces el tratamiento de los pacientes afectados de LMA con citarabina en infusión continua durante 7 días y una antraciclina (daunorrubicina o idarrubicina) durante 3 días (régimen 3+7).^{17,199} Con este esquema el 60-80% de los pacientes alcanzan una RC¹⁹, aunque una proporción importante de ellos presentará recaída y morirán a causa de su enfermedad. Además, existe un 20-50% de enfermos que serán resistentes al tratamiento de inducción, por lo que la investigación en el campo de la LMA y la búsqueda de nuevos tratamientos no ha cesado desde entonces. Los avances en la biología molecular de las LMA han contribuido sobre todo a un mejor conocimiento de las bases moleculares y patogénicas de esta enfermedad y a la definición de distintos grupos de riesgo e incluso al desarrollo de algunos tratamientos específicos como los inhibidores de FLT3.²⁰⁰ Pero estos avances no se han traducido en una mejora significativa de la supervivencia, y las únicas mejoras conseguidas se han debido básicamente a los progresos en el tratamiento de soporte de estos pacientes.²⁰¹

El carácter bifuncional de EDO-S101, con actividad como inhibidor de HDAC y actividad alquilante, podría jugar un papel en el tratamiento de la LMA. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron la actividad preclínica de agentes alquilantes como zalypsis¹⁴² y de moléculas inhibidoras de HDAC como panobinostat²⁰² así como la sinergia de éstos con

agentes utilizados en el tratamientos habitual de la LMA. A pesar de esos indicios, con los estudios realizados en este trabajo no podemos confirmar la eficacia de EDO-S101 en LMA. Otros esquemas terapéuticos, como combinaciones dobles, triples o secuenciales podrían ser eficaces en esta neoplasia; también la investigación en otras líneas celulares, dada la heterogeneidad de la enfermedad, podrían aportar datos de eficacia en futuros estudios.

CAPÍTULO IV. EVALUACIÓN

PRECLÍNICA DE LA COMBINACIÓN

ZALYPSIS + BORTEZOMIB +

DEXAMETASONA EN MIELOMA

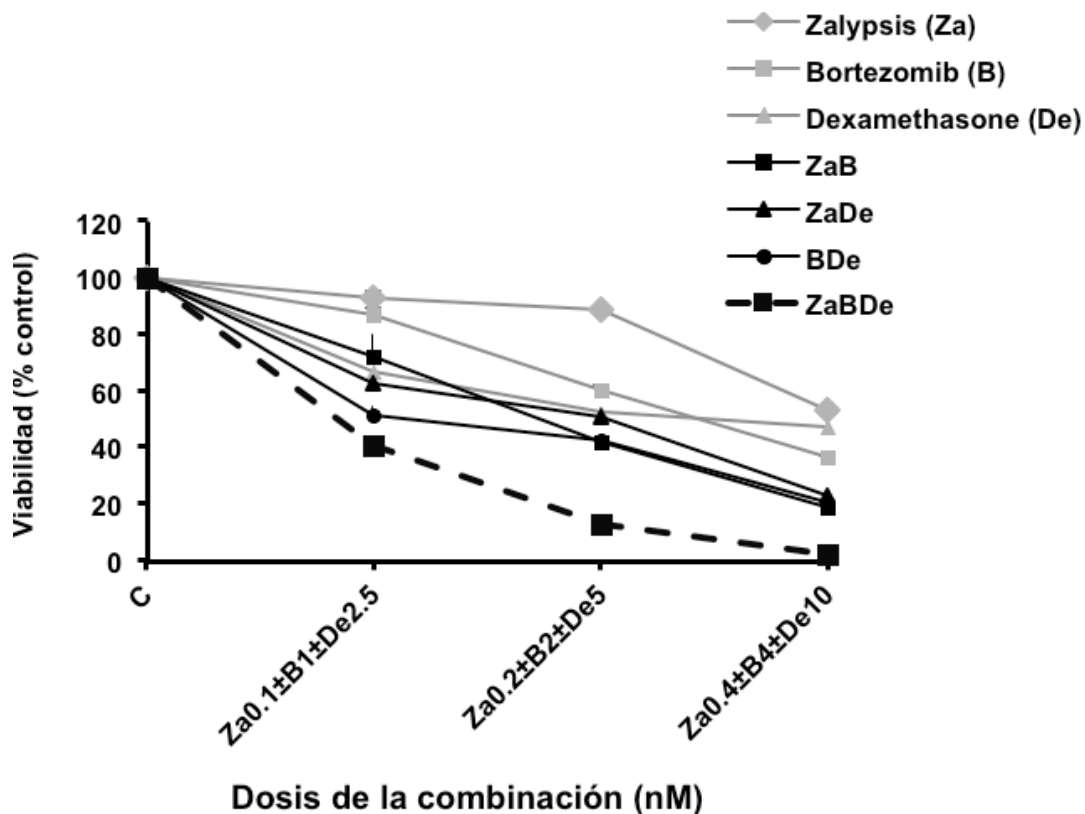
MÚLTIPLE

Zalypsis es una molécula que ha demostrado un potente efecto anti-mieloma en estudios pre-clínicos realizados por nuestro grupo²⁰³ y que también ha sido evaluada en un ensayo clínico fase I/II en pacientes con MM previamente refractarios a otras líneas de tratamiento. En este ensayo se observó que zalypsis era capaz de conseguir la estabilización de la enfermedad en algunos pacientes, sobre todo al combinarlo con dexametasona, con un perfil de toxicidad reversible y manejable.²⁰⁴ En base a estos resultados se planteó la hipótesis de que la combinación de zalypsis (Za) con uno de los estándares de tratamiento en MM como es bortezomib (B) + dexametasona (De), podría mejorar la eficacia de este esquema y ayudar a vencer las resistencias farmacológicas al actuar la triple combinación simultáneamente sobre distintas vías oncogénicas. En este capítulo se presentan los principales resultados al respecto que han sido publicados en la revista Haematologica.²⁰⁵

1. ESTUDIOS DE EFICACIA DE LA COMBINACIÓN ZALYPSIS + BOTEZOMIB + DEXAMETASONA *IN VITRO* Y *EX VIVO*

La eficacia de la triple combinación ZaBDe, se comparó con las tres combinaciones dobles (ZaB, ZaDe y BDe) y con los respectivos agentes en monoterapia, en la línea celular MM1S usando el ensayo de MTT durante un periodo de incubación de 48 horas. Los tres compuestos se combinaron con dosis subóptimas y crecientes manteniendo una proporción constante entre las concentraciones de los fármacos. Así se demostró que las combinaciones dobles eran más eficaces que los fármacos en monoterapia; además, la triple combinación demostró ser notablemente más eficaz que cualquiera de las dobles (Figura 4. 1).

Figura 4. 1 Estudio de eficacia en MM1S de zalypsis en combinación con distintas dosis de bortezomib y/o dexametasona



La sinergia entre los tres fármacos se estudió utilizando el software Calculusyn. Los índices de combinación (IC) para la triple combinación se encontraban en rangos sinérgicos, variando entre 0,2 y 0,6 en función de las dosis utilizadas (Tabla 4. 1).

Tabla 4. 1 Índices de combinación (IC) y fracción de células afectadas por el tratamiento (Fa). Resultados representativos de tres experimentos independientes

Za (nM)	B (nM)	De (nM)	Fa	IC
0.1	1		0.28	0.96
0.2	2		0.58	0.93
0.4	4		0.81	0.99
0.1		2.5	0.41	0.91
0.2		5	0.61	0.67
0.4		10	0.77	0.63
	1	2.5	0.49	0.75
	2	5	0.62	0.86
	4	10	0.81	0.80
0.1	1	2.5	0.59	0.60
0.2	2	5	0.87	0.41
0.4	4	10	0.98	0.24

Con el objetivo de estudiar la sinergia de la combinación ZaBDe en un contexto más fisiológico, se realizaron experimentos en los que la línea celular MM1S se cultivó en presencia de componentes del microambiente de la médula ósea (MO) por un periodo de 48 horas. Así, la triple combinación mantuvo su eficacia incluso en presencia de IL-6 o IGF-1 (Figura 4. 2). Además, se evaluó la eficacia de la combinación ZaBDe en la línea celular MM1S-luc en co-cultivo con células mesenquimales estromales de médula ósea (hMSC-TERT). La triple combinación, también en estas condiciones, conservó el efecto anti-mieloma (Figura 4. 3).

Figura 4. 2 Incubación de MM1S +/- IL-6 o IGF-1 durante 48 horas. Los datos se representan como la media de 3 experimentos independientes

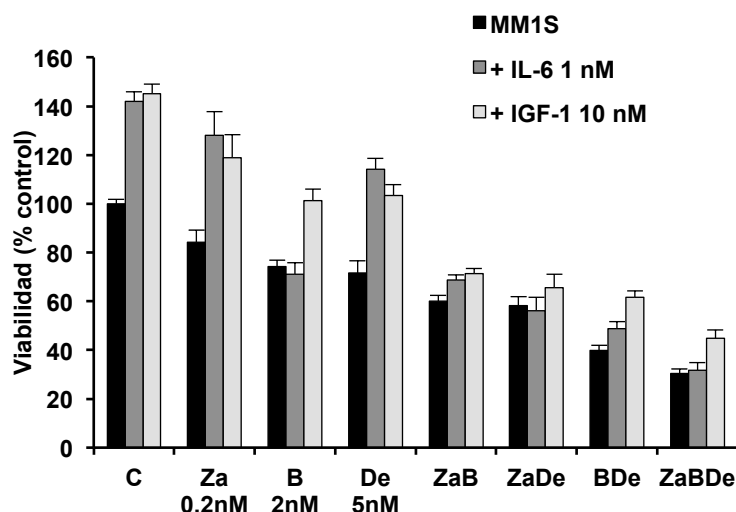
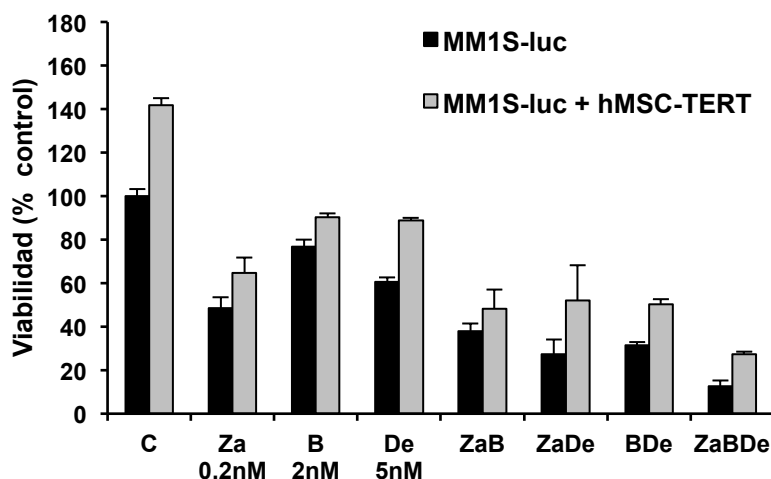


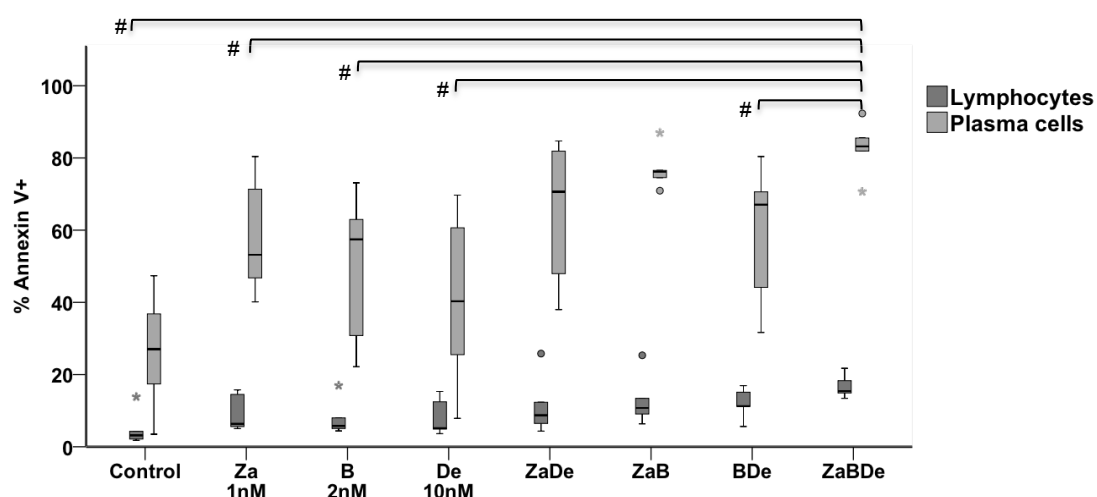
Figura 4. 3 Incubación de MM1S-luc +/- hMSC-TERT, durante 48 horas. Los datos se representan como la media de 3 experimentos independientes



Por último, se evaluó si el efecto sinérgico de ZaBDe se extendía a células de MM primarias extraídas de pacientes. Para ello se utilizaron células plasmáticas de médula ósea (MO) de 6 pacientes con MM que se incubaron *ex vivo* con los distintos fármacos durante 48 horas. ZaBDe fue

eficaz en todos los pacientes, incluyendo dos con delección de p53 (uno al diagnóstico y el otro tras haber recibido varias líneas de tratamiento sin respuesta), mejorando los resultados de las dobles combinaciones (Figura 4.4). Respecto a la toxicidad sobre los linfocitos normales de la MO, éstos quedaban mínimamente afectados por el tratamiento, observándose una evidente ventana terapéutica para la combinación ZaBDe (Figura 4.4).

Figura 4. 4 Células de MO de 6 pacientes con MM. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la apoptosis de células plasmáticas tratadas con ZaBDe y los tratamientos indicados(#p< 0.05)

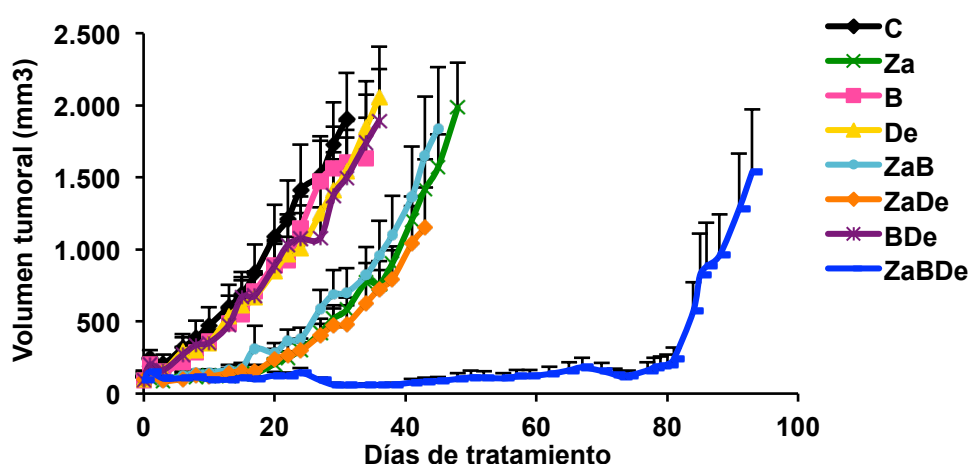


2. ESTUDIOS IN VIVO DE ZALYPSIS + BORTEZOMIB + DEXAMETASONA EN MODELOS MURINOS DE MM

La actividad anti-mieloma de la combinación ZaBDe fue evaluada *in vivo* en dos modelos murinos de xenoinjerto de MM: uno de plasmocitoma subcutáneo y otro de MM diseminado. En el primer modelo, ratones CB17-SCID con un plasmocitoma subcutáneo de células MM1S fueron aleatorizados a recibir tratamiento con vehículo (grupo control), zalypsis (0,75

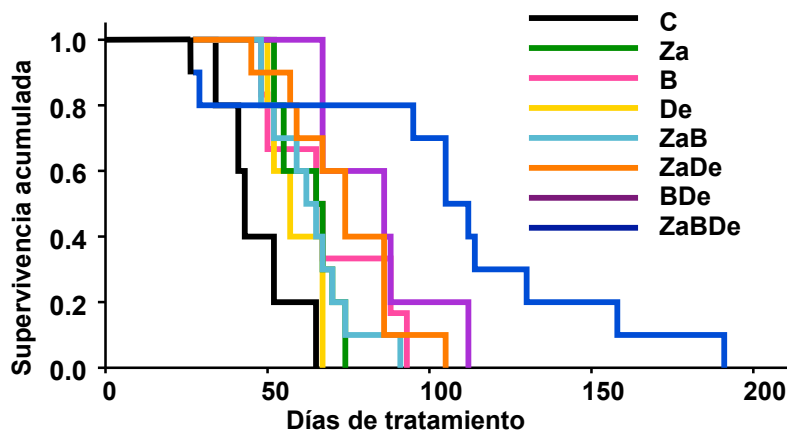
mg / kg iv, semanal, tres dosis totales), bortezomib (0,1 mg / kg ip, 5 días a la semana, de forma indefinida), dexametasona (1 mg / kg ip, 5 días por semana, de forma indefinida) y las respectivas combinaciones dobles y triple (n = 10 /grupo). Probablemente debido a las bajas dosis utilizadas, ninguna de las combinaciones dobles mejoró la actividad de los agentes en monoterapia de forma estadísticamente significativa. Sin embargo, cuando se combinaron los tres fármacos, se observó una clara inhibición del crecimiento tumoral que se mantuvo durante más de 75 días, comparándola con menos de 25 días para la doble combinación más activa (ZaDe). Las diferencias en el volumen tumoral de los ratones que recibieron la triple combinación fueron estadísticamente significativas desde el día 29 ($p < 0,001$) con respecto al resto de grupos de tratamiento (Figura 4. 5).

Figura 4. 5 Evolución del volumen tumoral del plasmocitoma subcutáneo desde el inicio del tratamiento



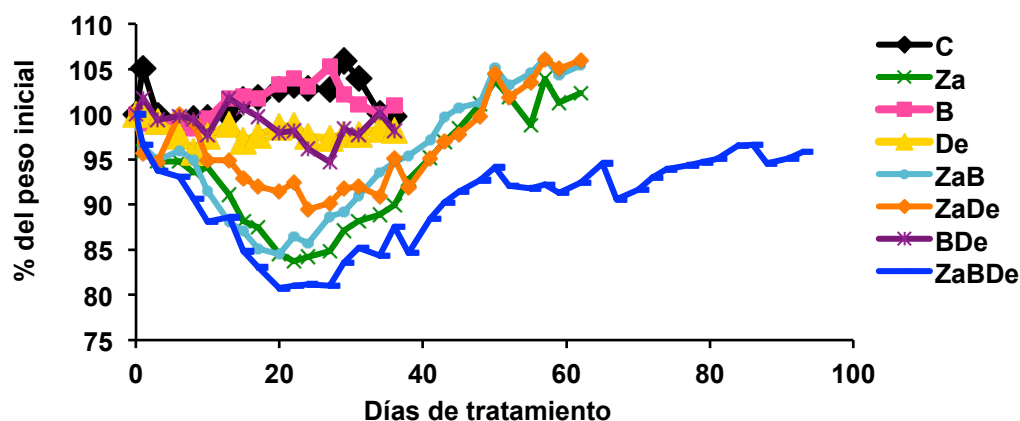
Además, estos resultados se tradujeron en una mejora de la supervivencia de los ratones tratados con la triple combinación, con una supervivencia media de 102 días (rango, 27 hasta 191 días), estadísticamente significativa en comparación con el resto de tratamientos (Log-Rank test, $p < 0,05$), (Figura 4. 6).

Figura 4. 6 Supervivencia de los distintos grupos de tratamiento en el modelo de plasmocitoma subcutáneo representada por curvas de Kaplan-Meier. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Log-rank test $p < 0.05$) entre ZaBDe y el resto de tratamientos



En lo que respecta a la toxicidad, se observó una pérdida moderada de peso corporal en los ratones que recibieron combinaciones que incluían zalypsis. Dos de los 10 ratones de la triple combinación fallecieron de forma prematura por toxicidad una vez recibidas las tres dosis programadas de zalypsis y mientras estaban siendo tratados con dexametasona + bortezomib. Los ratones restantes del grupo ZaBDe recuperaron completamente el peso corporal inicial (Figura 4. 7).

Figura 4. 7 Evolución del peso corporal de los ratones del modelo de plasmocitoma subcutáneo tratados con los fármacos y combinaciones indicadas



Debido a la toxicidad observada en este experimento y buscando una mayor eficacia de la combinación *in vivo*, se decidió ajustar las dosis de los distintos fármacos y valorar la eficacia de la triple combinación en un segundo modelo de MM, un modelo diseminado. En éste modelo, se inyectaron 3×10^6 células MM1S-luc por la vena caudal y los ratones fueron randomizados a los mismos grupos de tratamiento previamente comentados ($n = 5$ / grupo, excepto Za y ZaB con $n = 4$ / grupo). Otras modificaciones fueron: la administración de dexametasona dos días por semana en lugar de cinco, y el aumento de la dosis de bortezomib de 0,1 a 0,5 mg / kg. De manera semejante al experimento anterior, los ratones se trataron con zalypsis durante tres semanas, mientras que bortezomib y desametasona se administraron de forma indefinida. La triple combinación ZaBDe mostró un beneficio estadísticamente significativo ($p < 0,01$) en cuanto a la inhibición de la diseminación tumoral en comparación con las dobles combinaciones ZaDe, BDe y los agentes individuales (Figura 4. 8, Figura 4. 9). Aunque la doble combinación ZaB resultó ser muy eficaz en la inhibición de la diseminación tumoral, ZaBDe demostró ser aún más eficaz con diferencias estadísticamente significativas desde el día 62 de tratamiento ($p = 0,04$) (Figura 4. 8).

Figura 4. 8 Evolución de la carga tumoral de ratones CB-17 SCID con mieloma múltiple diseminado

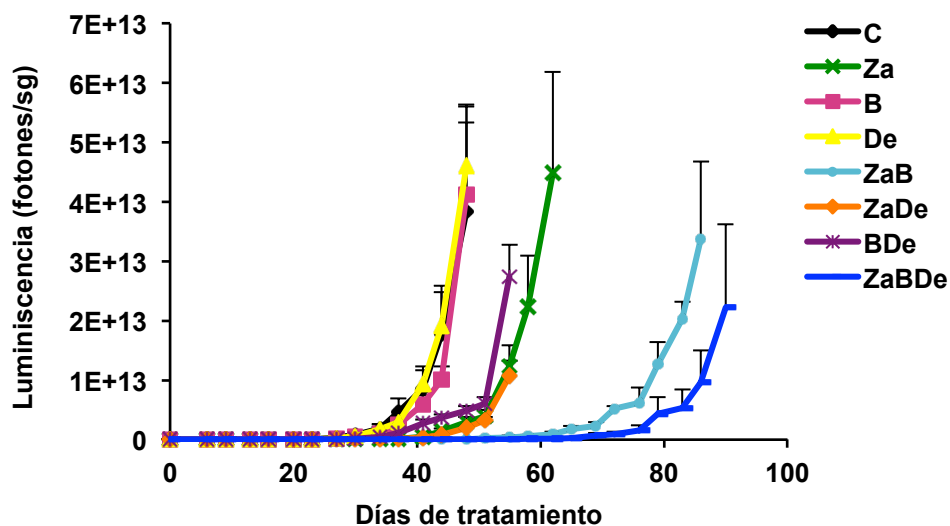
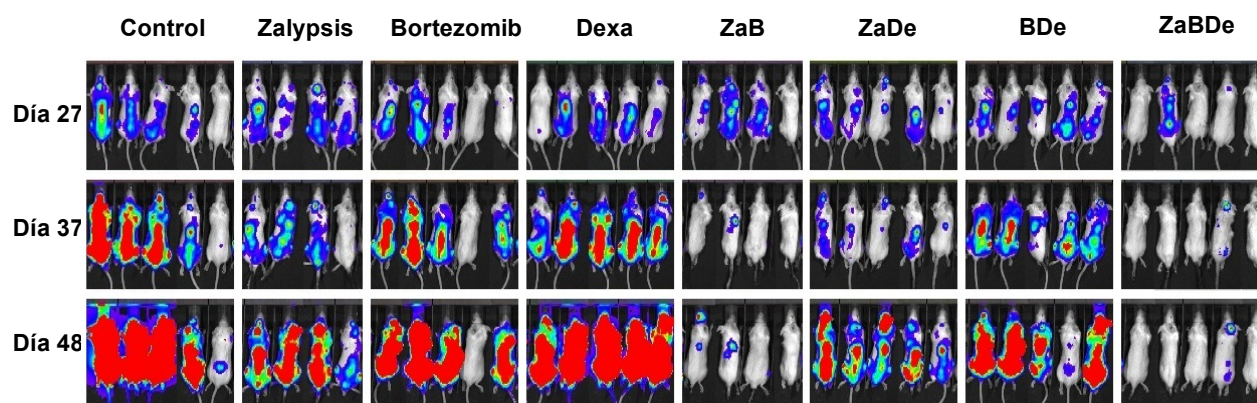
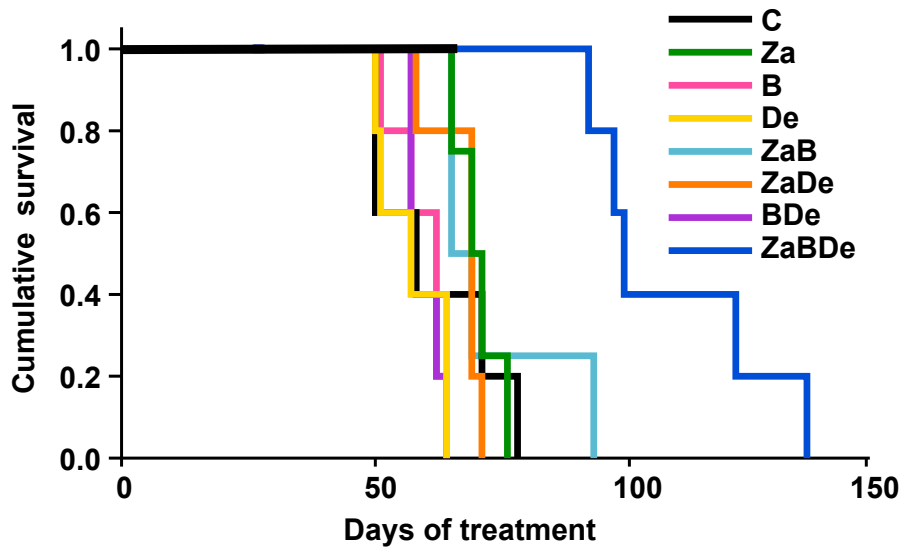


Figura 4. 9 Imágenes representativas de la carga tumoral, visualizada por bioluminiscencia de cada ratón en el modelo de mieloma diseminado. Las imágenes corresponden a los días 27, 37 y 48 tras iniciarse el tratamiento



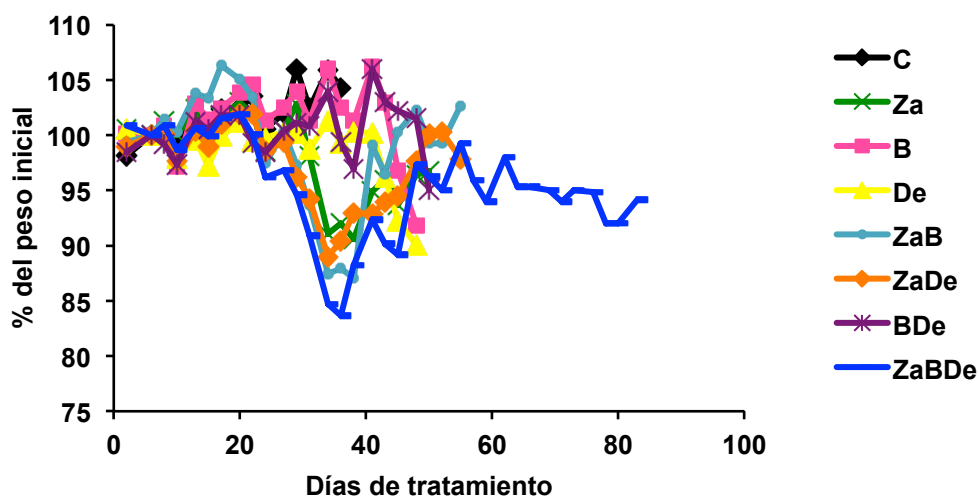
Además, el grupo ZaBDe alcanzó una mediana de supervivencia de 99 días (rango, 92 a 135 días), significativamente mejor que la mediana de 69 días (rango, 65 a 93 días) alcanzada por el grupo tratado con ZaB (Log-rank test, $p = 0,007$), (Figura 4. 10).

Figura 4. 10 Análisis y comparación de la supervivencia de los distintos grupos de tratamiento en el modelo murino de mieloma múltiple diseminado



En lo que respecta a la toxicidad, los ratones tratados con zalypsis tanto en monoterapia como en combinación mostraron una pérdida moderada de peso corporal que fue recuperada tras finalizar las tres dosis del fármaco planeadas (Figura 4.11).

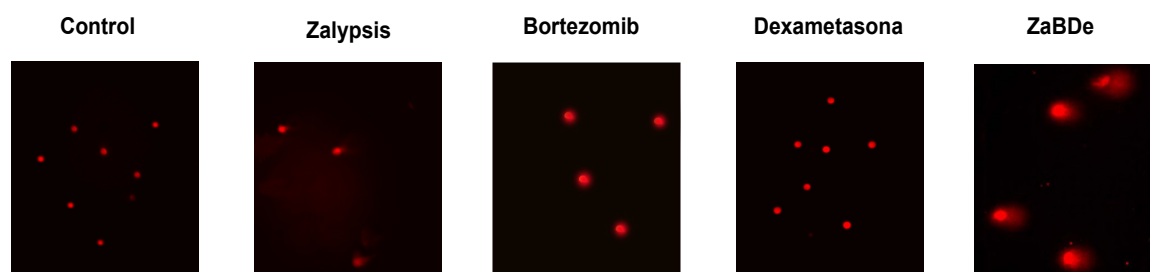
Figura 4. 11 Porcentaje de variación del peso de los ratones durante el estudio en el modelo de MM diseminado



3. ANÁLISIS DEL MECANISMO DE DE ACCIÓN DE LA TRIPLE COMBINACIÓN ZALYPSIS + BORTEZOMIB + DEXAMETASONA

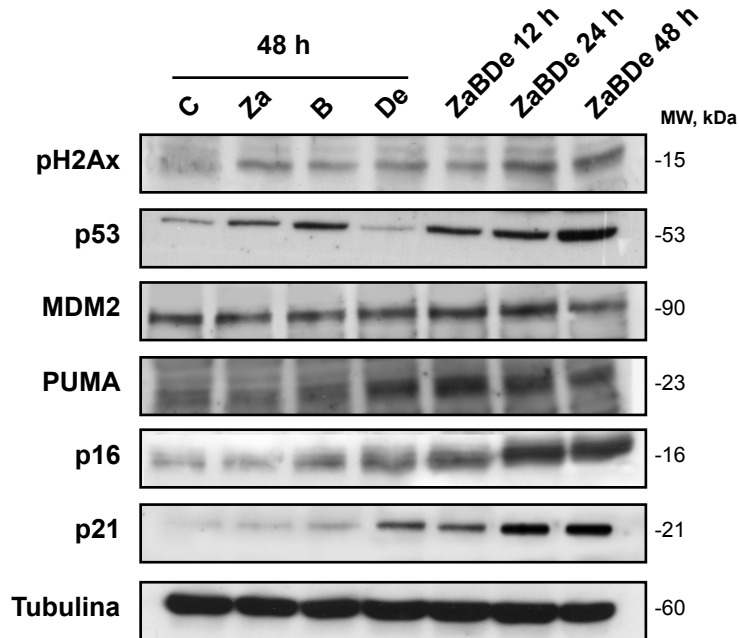
Nuestro grupo había demostrado previamente que zalypsis actúa, al menos parcialmente, a través de la inducción de daño sobre el ADN, utilizando mecanismos dependientes e independientes de p53.²⁰³ En el presente estudio se demostró que la combinación ZaBDe indujo la fragmentación del ADN como se observa en el ensayo cometa (Figura 4. 12). Para realizar el ensayo cometa y estudiar el mecanismo de acción se utilizaron las siguientes dosis y grupos: control (vehículo de zalypsis), zalypsis 0.2 nM, bortezomib 2 nM, dexametasona 5 nM y la triple combinación ZaBDe a las mismas dosis indicadas para cada fármaco.

Figura 4. 12 Ensayo cometa en células MM1S después de ser tratadas durante 48 horas con los fármacos indicados y las dosis ya mencionadas



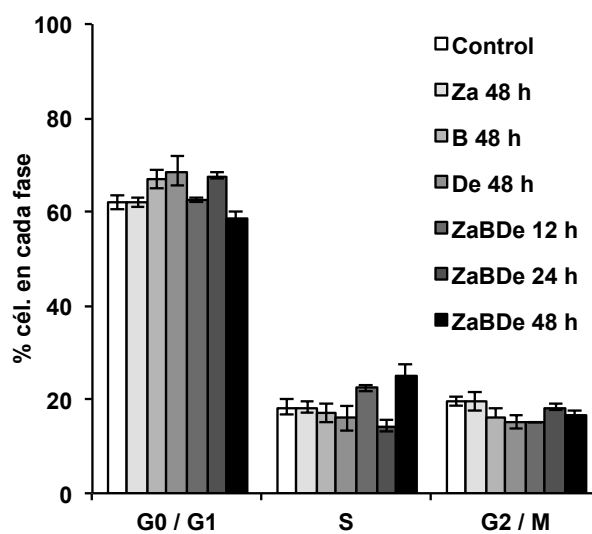
Además, la triple combinación indujo un aumento de la fosforilación de H2AX, un marcador de roturas de doble cadena (DSB) del ADN, comparado con zalypsis en monoterapia. El tratamiento de la línea MM1S con ZaBDe también indujo un aumento temprano de p53, indicando una respuesta al daño sobre el ADN. Este efecto fue más evidente que el inducido por bortezomib o zalypsis por separado. Algunas proteínas diana de p53, como PUMA, p16 y p21, también se indujeron tras sólo 12 horas de tratamiento; mientras que los niveles del inhibidor de p53, MDM2, no presentaron cambios significativos (Figura 4. 13).

Figura 4. 13 Proteínas implicadas en la respuesta al daño a ADN, tras 48 horas de incubación de MM1S



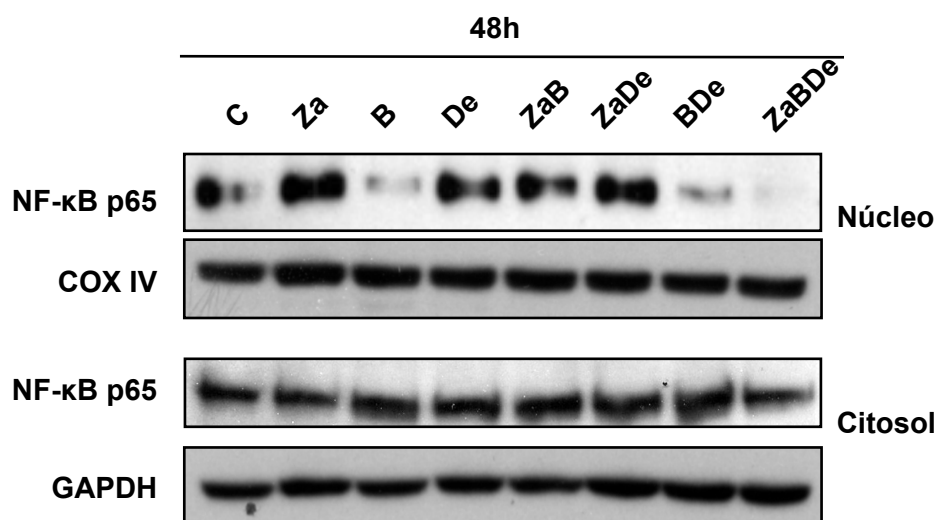
A pesar de los niveles aumentados de los reguladores del ciclo celular p16 y p21, el perfil del ciclo celular no mostró modificaciones significativas (Figura 4. 14).

Figura 4. 14 Análisis del ciclo celular de la línea MM1S tras 48 horas de incubación con los fármacos indicados



Como aparece descrito en la literatura, la vía de NF- κ B también se activa en respuesta al daño sobre el ADN en un intento de conseguir la supervivencia celular a pesar de la genotoxicidad.²⁰⁶ En nuestro estudio, aunque los niveles de la subunidad p65 de NF- κ B no mostraron cambios significativos en el citosol tras el tratamiento con la triple combinación, sí se observó una clara disminución de los niveles de NF- κ B en el núcleo tras 48 horas de incubación con ZaBDe. Esto sugiere que con la tripe combinación NF- κ B no está activo, y por tanto el mecanismo de resistencia que induce se encuentra disminuido. Por el contrario, no se observó una reducción de los niveles de NF- κ B tras el tratamiento con los agentes en monoterapia, aunque si se evidenció con la doble combinación BDe, disminuyéndose aún más al añadir zalypsis en la triple combinación (Figura 4. 15).

Figura 4. 15 Niveles de NF- κ B en núcleo y citosol en la línea MM1S tras 48 horas de incubación con las drogas indicadas



Atendiendo al mecanismo final desencadenante de la muerte celular, por un lado, se demostró que ZaBDe inducía apoptosis celular en base al aumento de células Anexina V positivas observable por citometría de flujo (Figura 4. 16). Por otro lado también observamos el procesamiento de las

caspasas -8, -9, -3 y PARP mediante Western blot (Figura 4. 17). Estos resultados sugieren la implicación de la caspasas en la muerte celular, con implicación tanto de la vía extrínseca como intrínseca de la apoptosis.

Figura 4. 16 Evaluación de la inducción de apoptosis por citometría de flujo en células MM1S tratadas con las drogas, tiempos y combinaciones indicadas. Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes

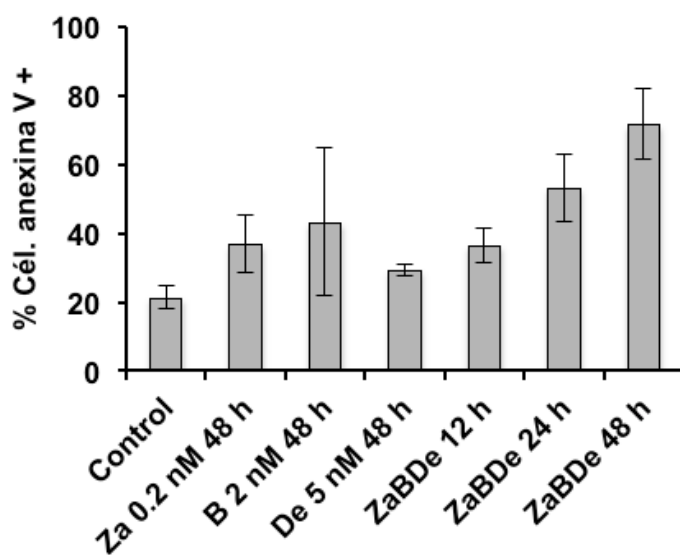
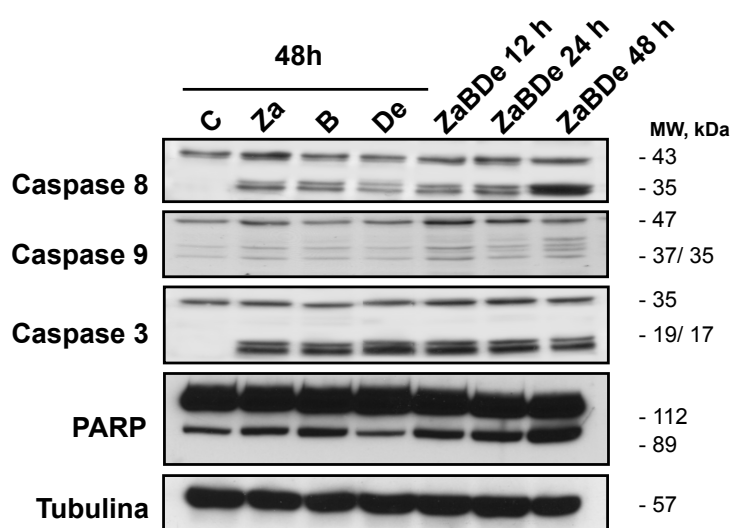
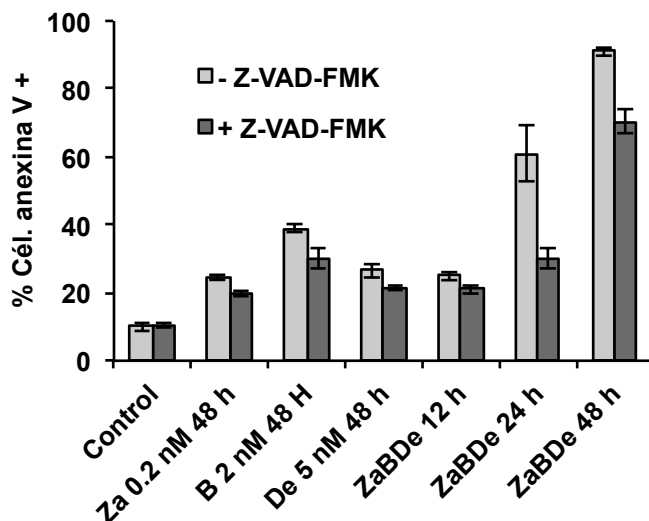


Figura 4. 17 Inducción de proteínas implicadas en la muerte celular tras exposición a las distintas drogas o combinaciones a los tiempos indicados



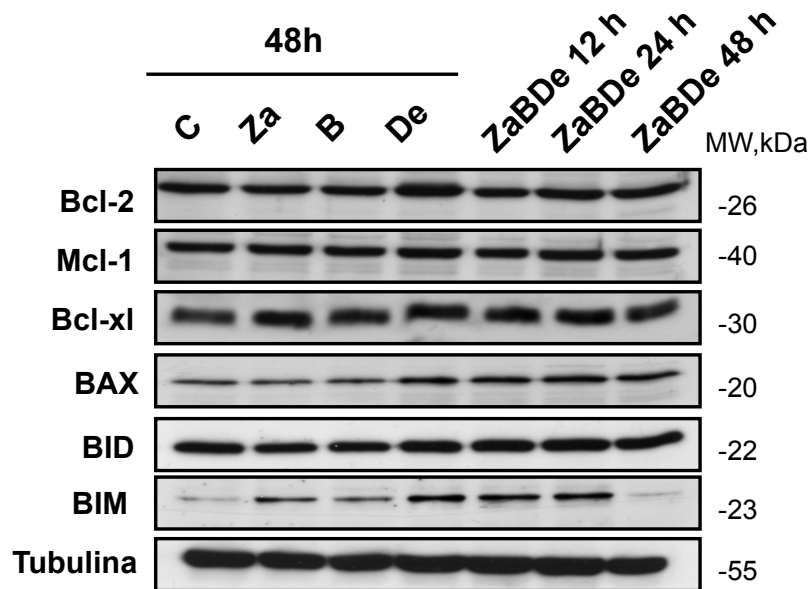
Sin embargo, el hecho de que el pre-tratamiento con el inhibidor de pan-caspasas Z-VAD-FMK (50 μ M administrado cada 24 horas) sólo rescate parcialmente de la apoptosis, parece indicar la participación concomitante de otros mecanismos caspasa - independientes en la muerte celular (Figura 4. 18).

Figura 4. 18 Análisis de la apoptosis en MM1S +/- preincubación con Z-VAD-FMK. Los datos se presentan como media \pm DE de tres experimentos independientes



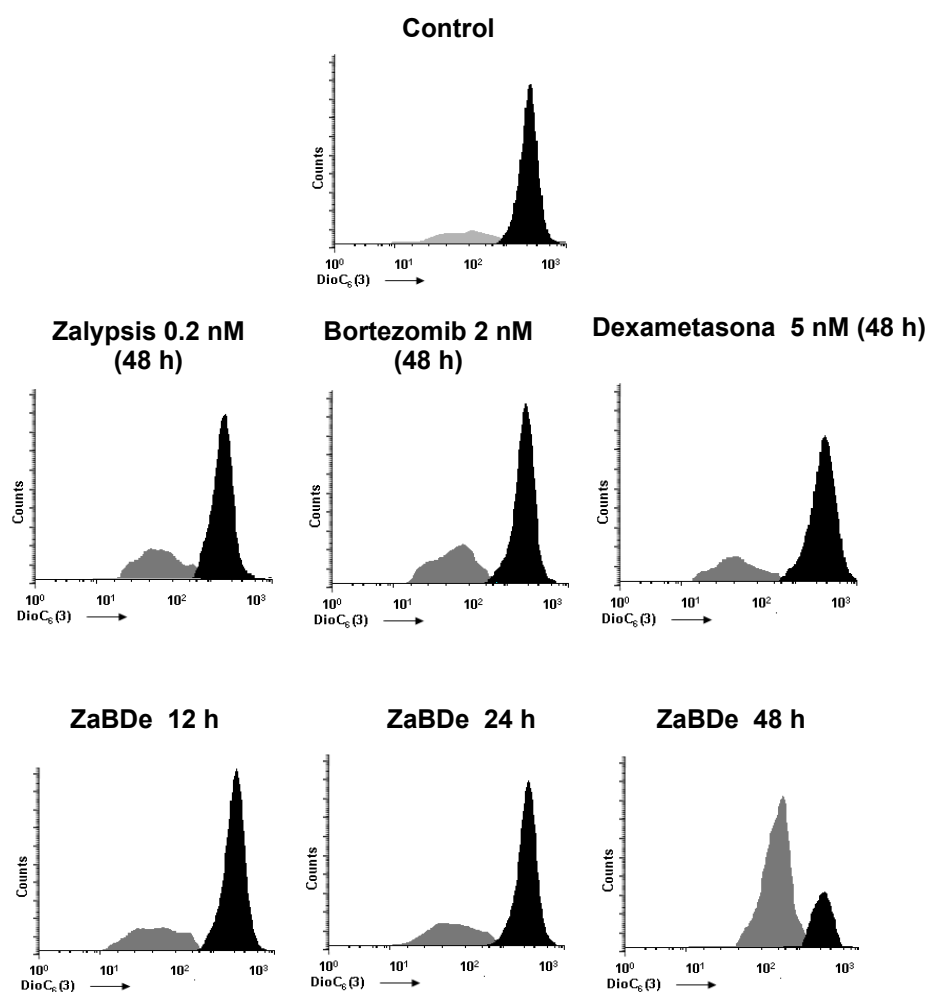
Debido a su implicación en la regulación de la vía intrínseca de apoptosis, también se estudió el papel de los miembros de la familia Bcl-2 en el mecanismo de apoptosis inducida por ZaBDe. En este sentido, solamente se observó un aumento temprano de BIM (con una bajada posterior) y un ligero aumento de BAX después del tratamiento con la triple combinación (Figura 4. 19).

Figura 4. 19 Proteínas de la familia Bcl-2 analizadas por Western blot en la línea celular MM1S tras el tratamiento con las drogas, combinaciones y tiempos indicados



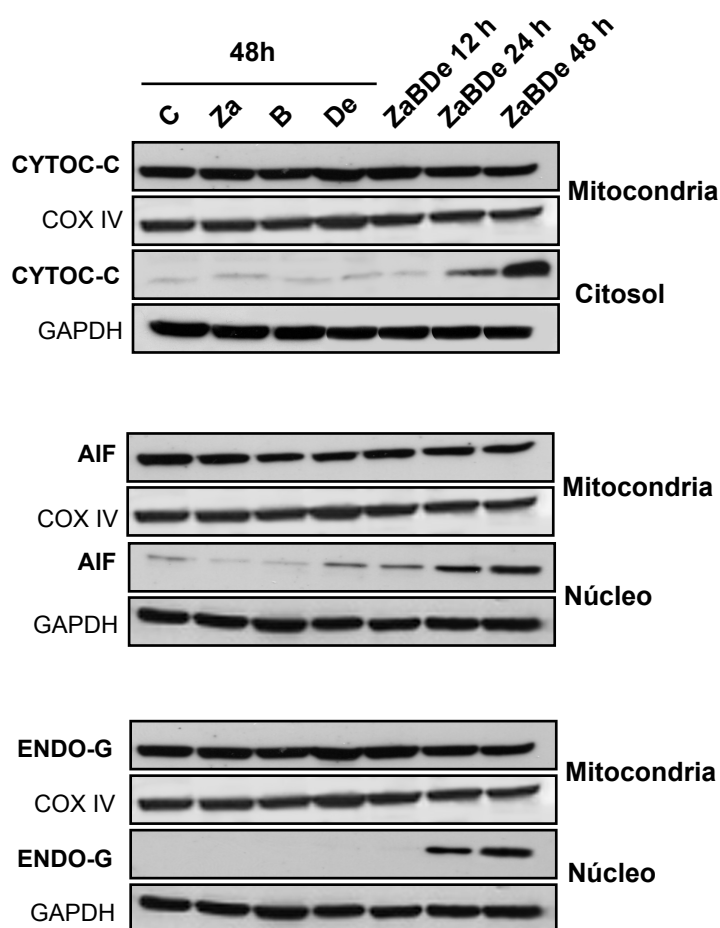
BIM y BAX son proteínas pro-apoptóticas estrechamente asociadas a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, por lo que la pérdida de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) observable por citometría después del marcaje con DiOC6(3) puede deberse en parte a la actividad de estas proteínas (Figura 4. 20).

Figura 4. 20 Análisis del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).



De acuerdo con este aumento de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, se observó un aumento de los niveles del citocromo C en el citosol tras el tratamiento con ZaBDe. Además, los niveles de otras proteínas implicadas en la vía apoptótica independiente de caspasas, tales como AIF (*apoptosis-inducing factor*) y Endo-G (*endonuclease G*)²⁰⁷ también se encontraron aumentados en el núcleo donde estas proteínas desarrollan su actividad pro-apoptótica (Figura 4. 21).

Figura 4. 21 Localización de distintas proteínas implicadas en la muerte celular tras incubación con las drogas que se indican y a los tiempos referidos



4. EFICACIA DE LA TRIPLE COMBINACIÓN ZALYPSIS + BORTEZOMIB + DEXAMETASONA EN MM. DISCUSIÓN.

La naturaleza incurable del MM y el mal pronóstico de los pacientes que se vuelven refractarios a los estándares actuales de tratamiento, hacen que sea necesaria la búsqueda de nuevos compuestos o combinaciones que ataquen múltiples vías oncogénicas de forma simultánea. En este contexto,

este trabajo ha evaluado la combinación de bortezomib y dexametasona con zalypsis, un nuevo agente derivado de organismos marinos que daña el ADN, y que ha demostrado efecto anti-mieloma en estudios preclínicos²⁰³ y en ensayos preclínicos fase I/II.²⁰⁴

Nuestro estudio muestra que la combinación ZaBDe fue más eficaz que los agentes en monoterapia y que las combinaciones dobles, tanto en líneas celulares de MM *in vitro* como *ex vivo* en muestras de pacientes, con diferencias altamente significativas y con ICs en el rango sinérgico. Más aún, los resultados más llamativos fueron las diferencias en términos de inhibición del crecimiento tumoral y en la supervivencia en los dos modelos murinos analizados. Este potente efecto sinérgico sugiere que incluso con dosis bajas de los agentes que participan en la triple combinación, se puede obtener un beneficio clínico significativo, con un perfil de toxicidad aceptable. Respecto a la toxicidad, los estudios *ex vivo* en muestras de pacientes han demostrado que la triple combinación induce la apoptosis de células plasmáticas preservando al mismo tiempo los linfocitos normales de la médula, y asegurando de esta manera la tolerabilidad del tratamiento. Esto es importante porque una de las principales toxicidades con zalypsis en monoterapia es hematológica, y con estos resultados se evidencia que la toxicidad será menor con la combinación, ya que es posible que se puedan reducir las dosis de los fármacos lográndose además una mayor eficacia. De hecho, en el estudio publicado previamente sobre el efecto preclínico de zalypsis en monoterapia²⁰³ el agente fue bastante tóxico para los linfocitos normales de MO de pacientes *ex vivo*. Sin embargo, en el presente trabajo, la toxicidad de los linfocitos fue mucho menor de lo esperado, probablemente debido a las dosis más bajas de zalypsis utilizadas. Los estudios *in vivo* apoyan la buena tolerancia de la combinación, porque a pesar de las dos muertes tempranas de los diez ratones del grupo ZaBDe en el modelo de plasmocitoma, el modelo diseminado mostró una excelente tolerabilidad manteniendo la eficacia.

Atendiendo al mecanismo de acción, este estudio ha demostrado que la triple combinación puede aumentar de forma sinérgica el daño sobre el ADN, tal como indica el aumento en la fosforilación de H2AX, marcador de

DSB. Las DSBs son las formas más severas de daño en el ADN y afectan a la estabilidad genómica. El supresor de tumores p53 desempeña un papel importante en la respuesta a este tipo de daño sobre el ADN, ya sea mediante la detención del ciclo celular en un intento de reparar el daño, o induciendo la muerte celular en las células con un daño severo.²⁰⁸ El daño sobre el ADN inducido por la combinación ZaBDe parece ser severo, ya que se detectó un efecto preferencialmente apoptótico, en lugar de la detención del ciclo celular. Por otra parte, la inhibición de la recombinación homóloga inducida por bortezomib²⁰⁹ podría también jugar un importante papel en esta sinergia. Además, en base a los estudios *ex vivo* y a los resultados anteriores con zalypsis en monoterapia,²⁰³ podríamos decir que la triple combinación, ZaBDe, es efectiva también en células plasmáticas con delección de p53, un marcador de mal pronóstico en los pacientes con MM.^{4,210}

La inducción de apoptosis tras el daño sobre el ADN, puede ser inhibida por el factor de transcripción NF- κ B²¹¹, un heterodímero compuesto de las subunidades p50 and p65 y que es el principal factor de transcripción de supervivencia en la respuesta a daño.²⁰⁶ En este estudio, hemos observado que la combinación ZaBDe puede bloquear la activación de NF- κ B mediante la prevención de su translocación al núcleo en respuesta al daño del ADN, un evento que no se observó con zalypsis ni con dexametasona en monoterapia, pero que se evidenció con la triple combinación.

La vía mitocondrial parece jugar un papel importante en el mecanismo apoptótico de ZaBDe, con la activación simultánea de rutas dependientes de caspasas y caspasa-independientes. Por un lado, el citocromo C, un importante activador de caspasas, parece ser liberado al citosol, donde en última instancia, ejerce su actividad a través de mecanismos dependientes de caspasas; por otra parte, dos proteínas implicadas en la apoptosis independiente de caspasas, AIF y endo -G, son trasladadas de la mitocondria al núcleo. Éstas dos últimas proteínas se han relacionado con la fragmentación del ADN, la condensación nuclear y la muerte celular,²¹² incluso en presencia de inhibidores de caspasa.⁴⁴

En conclusión, hemos demostrado la sinergia de la triple combinación ZaBDe en varios modelos preclínicos de MM. La actividad anti-mieloma de

esta combinación se basa en parte en la inducción de daño sobre el ADN y al bloqueo de la activación de NF- κ B, lo que resulta en la inducción final de la apoptosis mediante mecanismos caspasa-dependiente y caspasa-independiente. Estos resultados sirven de base para el diseño de futuros ensayos clínicos que utilicen la combinación ZaBDe para el tratamiento de pacientes con MM en recaída y refractario.

CAPÍTULO V. ESTUDIO PRECLÍNICO DE

LA EFICACIA DEL INHIBIDOR DE PIM

QUINASAS PIM447 EN LEUCEMIA

LINFÁTICA CRÓNICA

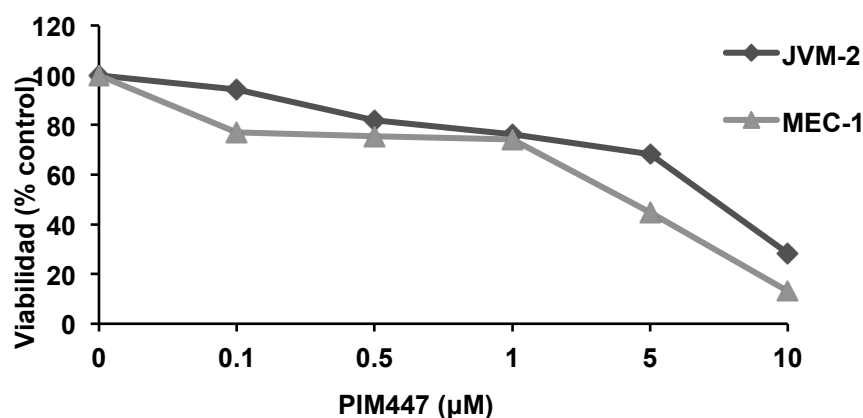
Nuestro grupo ya ha demostrado la eficacia y descrito con detalle el mecanismo de acción de este fármaco en otro tipo de neoplasia de células B maduras como es el MM.¹⁵⁹ Como se comentó en la Introducción, existe evidencia científica que apoyaría el uso de PIM447, como agente pan inhibidor de las PIM quinasas en la LLC. Este capítulo está enfocado a evaluar la eficacia de PIM447 en células de pacientes con esta enfermedad, estudiar el potencial efecto sinérgico del fármaco en combinación y correlacionar el papel de PIM2 con el pronóstico y la evolución de LLC.

1. ESTUDIO DE EFICACIA EN LÍNEAS CELULARES DE LLC DE PIM447

Cabe destacar en este punto que los estudios en LLC siempre se han visto limitados por el hecho de no existir líneas celulares inmortalizadas y fielmente representativas de la enfermedad, ya que se trata de células con muy escasa capacidad proliferativa. Algunas líneas celulares como OSU-CLL²¹³ o JVM-2²¹⁴ se han generado a partir de células de pacientes con LLC pero deben ser infectadas por el virus Epstein Barr para ser inmortales. Otras líneas celulares como MEC-1 o MEC-2²¹⁵, se derivan de células de LLC aunque en transformación pro-linfocítica. Puesto que las líneas celulares de las que disponemos en la actualidad no son rigurosamente representativas de la LLC, se decidió hacer el estudio *ex vivo* en células frescas de sangre periférica de pacientes con LLC en distintos estadios de la enfermedad. Sí se

utilizaron las líneas comentadas con el fin de obtener un indicador del rango de dosis en el que actúa este fármaco. Así, el inhibidor de pan PIM quinasa, PIM447, fue activo en las dos líneas celulares estudiadas, MEC-1 (IC₅₀ 5 μ M) y JVM2 (IC₅₀ 7 μ M), respectivamente (Figura 5. 1).

Figura 5. 1 Líneas celulares de LLC tratadas con PIM447



2. ANÁLISIS DE LA EFICACIA DE PIM447 EN CÉLULAS B PATOLÓGICAS DE PACIENTES CON LLC

Se analizaron muestras de 19 pacientes: 2 de ellos con diagnóstico de LBM (linfocitosis B monoclonal), 12 con LLC estable sin criterios para iniciar tratamiento y 5 con diagnóstico de LLC activa que cumplieran criterios para iniciar tratamiento. En este último caso las muestras se extrajeron antes de iniciarse el esquema terapéutico indicado en cada caso. El fármaco fue eficaz en la mayoría de muestras evaluadas (Figura 5. 2) no encontrándose diferencias significativas entre la IC₅₀ de las muestras con LLC asintomática, (Figura 5. 3), LLC activa (Figura 5. 4), IGHV mutada o no mutada (Tabla 5. 1). Cabe destacar que la muestra más resistente (muestra 32) fue la de un paciente con LLC activa con criterios de mal pronóstico (IGHV no mutado).

Figura 5. 2 Linfocitos con fenotipo de LLC extraídos de muestras de pacientes y tratados *ex vivo* con PIM447 durante 48 horas

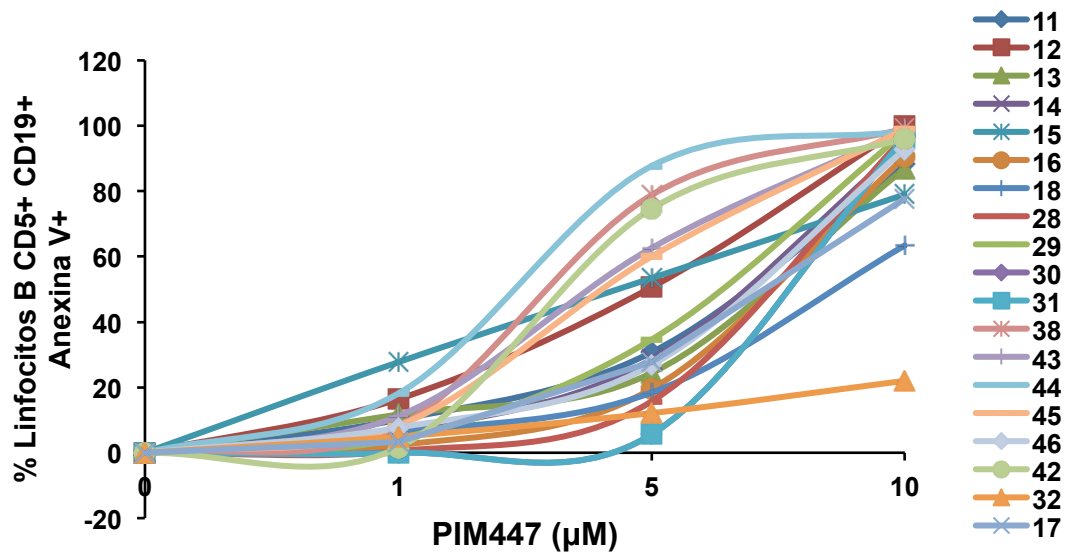


Figura 5. 3 Linfocitos con fenotipo de LLC de pacientes con LLC estable y sin criterios de tratamiento

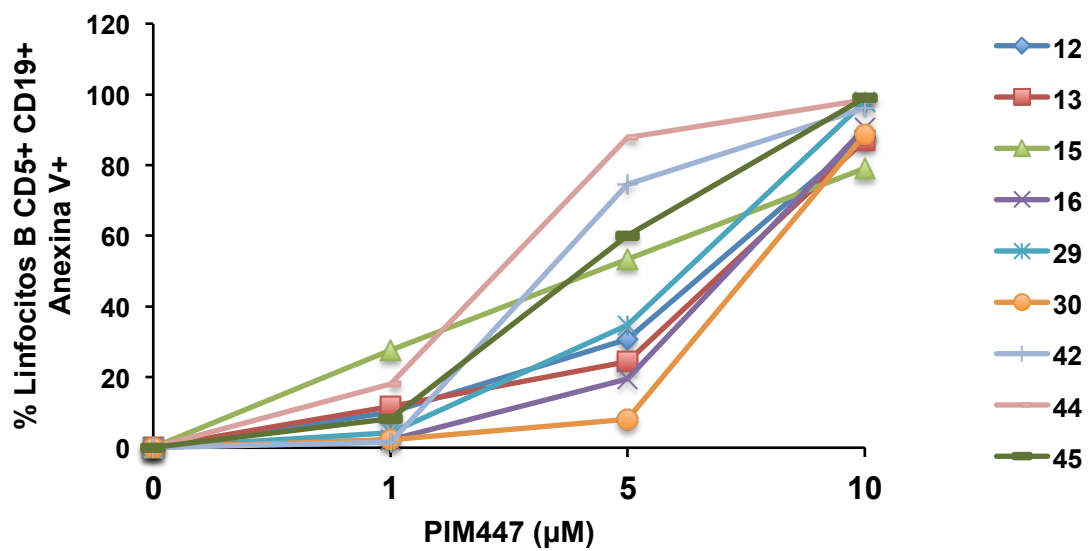


Figura 5. 4 Linfocitos con fenotipo de LLC de pacientes con LLC activa

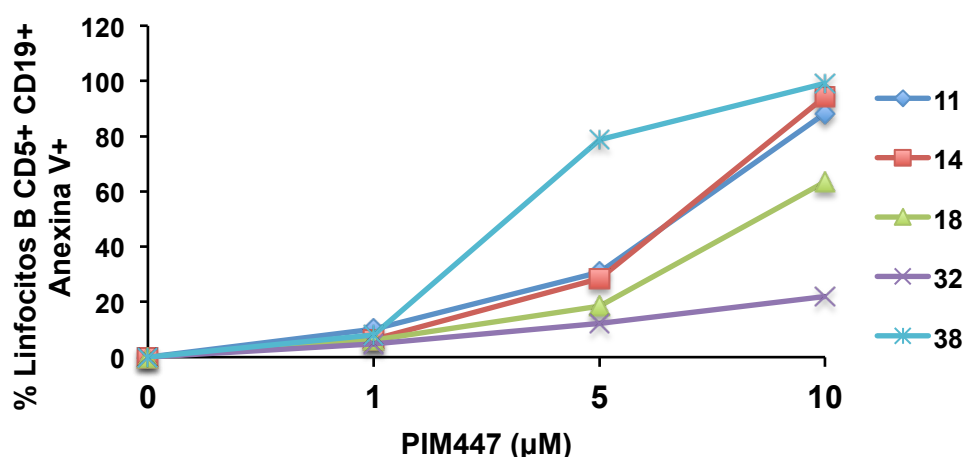


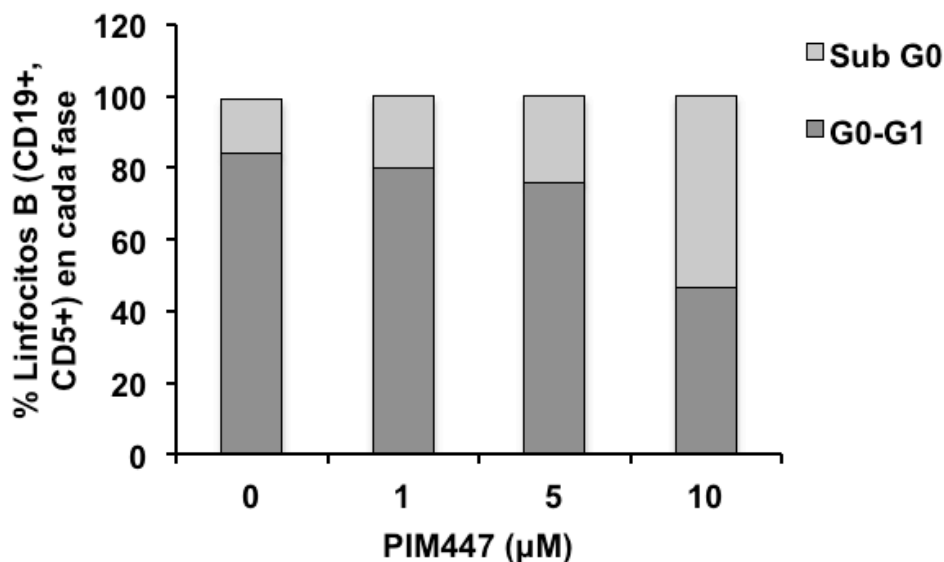
Tabla 5. 1 IC50 de PIM447 en muestras de pacientes agrupadas por estadios de la enfermedad y por estado mutacional de IGHV

	LBM	LLC estable	LLC activa	IGHV mutado	IGHV no mutado
	17	12	11	12	11
	31	13	14	13	14
		15	18	15	17
		16	32	16	18
		29	38	29	38
		30		30	44
		42		31	32
		44		42	
		45		45	
IC 50 (μM)	6,76	4,83	4,71	5,32	4,68

Además se evaluó si PIM447 tenía algún efecto sobre el ciclo celular de las células de los linfocitos B de LLC. Como se ha descrito previamente, los linfocitos típicos de LLC se caracterizan por una apoptosis defectuosa más que por una capacidad proliferativa aumentada. De hecho, la mayoría de los linfocitos se encuentran en fase G₀ como se confirmó también en nuestro estudio. Tras 24 horas de incubación con el inhibidor de PIM quinasas a dosis crecientes se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos en Sub G₀

(indicando células muertas) y una disminución de linfocitos en fase G₀-G₁ sin distinguirse linfocitos en las otras fases del ciclo celular (Figura 5. 5). Esto indica el efecto predominantemente apoptótico de PIM447 en estas células frente a un papel antiproliferativo.

Figura 5. 5 Ciclo celular de linfocitos de LLC de paciente, tratados ex vivo con PIM447

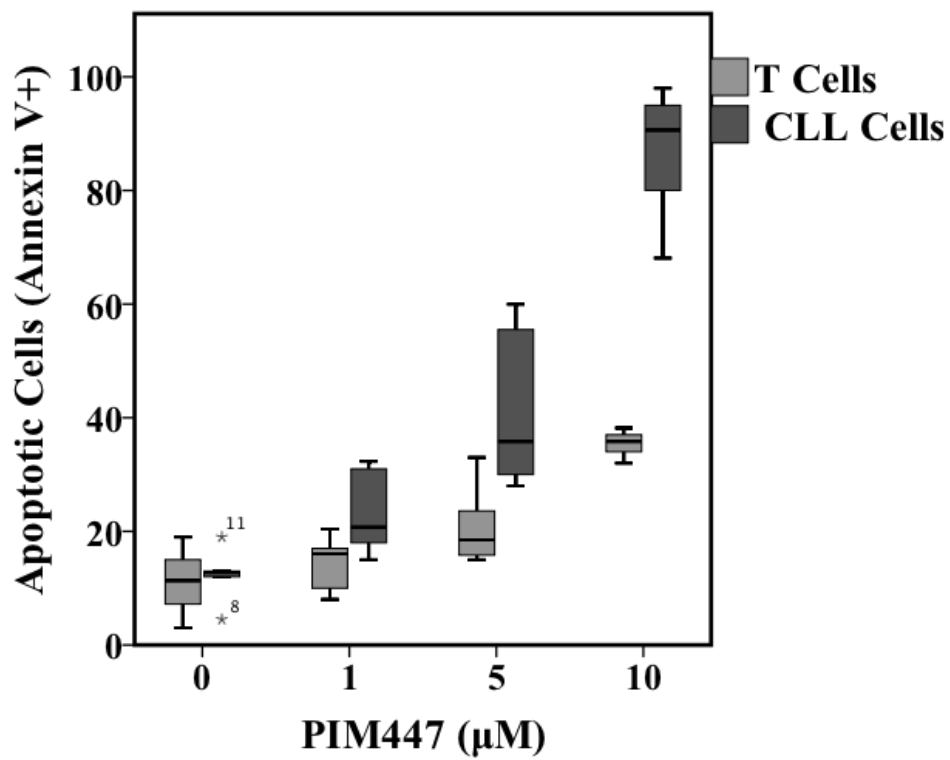


3. ESTUDIO DE TOXICIDAD DE PIM447 EN LINFOCITOS T

Un punto importante a valorar cuando realizamos el estudio preclínico de una nueva molécula es la toxicidad hematológica. En el caso de la LLC nos interesa inducir una muerte selectiva de los linfocitos patológicos B conservando en la medida de lo posible otras células como los linfocitos T, lo que conllevaría un menor riesgo de infecciones en pacientes que ya presentan una predisposición a ellas dada la naturaleza de la enfermedad. En este caso utilizamos 6 muestras de pacientes con LLC para comparar la toxicidad de PIM447 sobre linfocitos B patológicos y linfocitos T normales. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la muerte inducida sobre linfocitos B y T utilizando PIM447 5 µM ($p= 0.009$) y PIM447 10 µM (

P= 0.002), lo que es indicativo de una clara ventana terapéutica para este fármaco en LLC (Figura 5. 6).

Figura 5. 6 Diagrama de cajas que representa la toxicidad de PIM447 sobre los dos tipos celulares indicados



4. ESTUDIO DE LA SINERGIA DE PIM447 CON OTROS FÁRMACOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA LLC

Además del efecto que PIM447 pueda desempeñar en monoterapia, se decidió estudiar la existencia de posibles sinergias al combinarla con otros fármacos utilizados en el tratamiento de la LLC. Así, se evaluaron las combinaciones de PIM447 con el alquilante bendamustina (Figura 5. 7, Tabla 5. 2), y con un análogo de purinas, la fludarabina (Figura 5. 8, Tabla 5. 3), utilizando la línea celular MEC-1. Se demostró que PIM447 podía potenciar la eficacia de ambos fármacos *in vitro*, siendo especialmente eficaz la combinación de PIM447 con fludarabina mostrando índices de combinación (IC) en rangos claramente sinérgicos (0,1-0,6).

Figura 5. 7 Análisis de la eficacia de PIM447 en combinación con bendamustina en la línea celular MEC-1 tras 48 horas de incubación

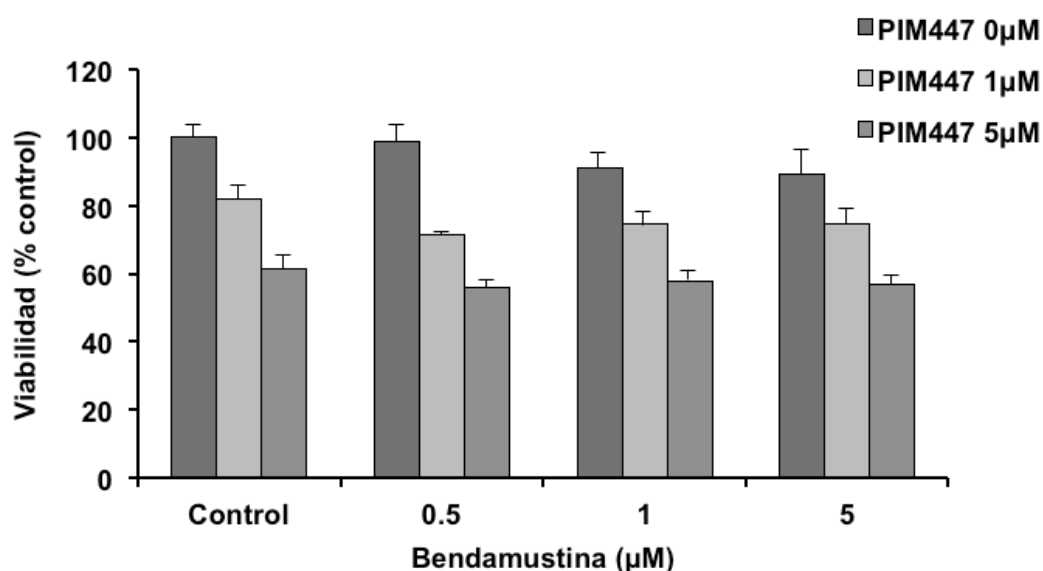


Tabla 5. 2. . Índices de combinación de PIM447 con bendamustina en la línea celular MEC-1 para las dosis indicadas

PIM447 (μM)	Bendamustina (μM)	IC
1	0,45	0,654
1	1	1,188
1	5	0,816
5	0,5	1,349
5	1	0,911
5	5	1,271

Figura 5. 8 PIM447 en combinación con fludarabina en la línea MEC-1 en tras 48 horas de incubación

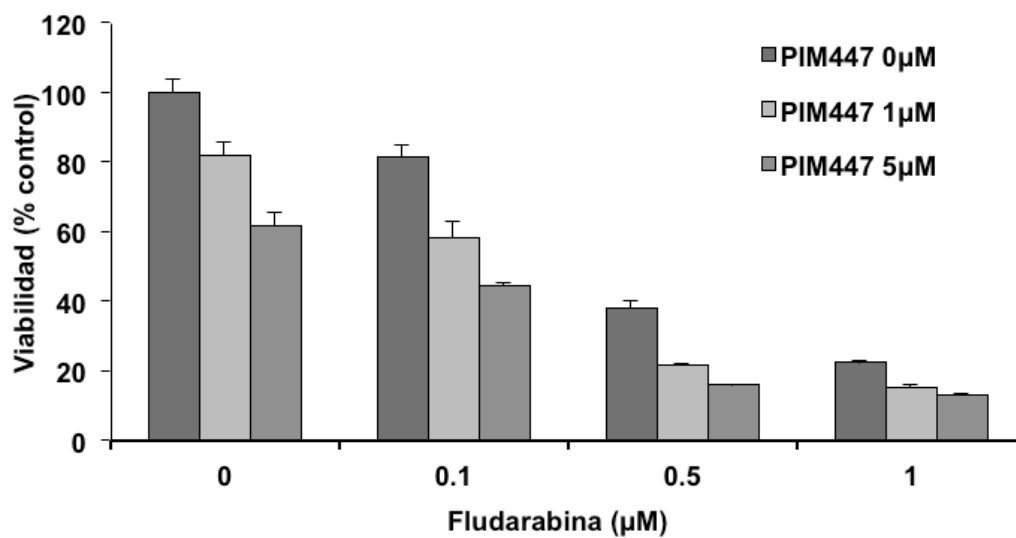


Tabla 5. 3. Índices de combinación de PIM447 con fludarabina en la línea celular MEC-1 para las dosis indicadas

PIM447 (µM)	Fludarabina (µM)	IC
1	0,1	0,669
1	0,5	0,177
1	1	0,166
5	0,1	0,786
5	0,5	0,159
5	1	0,172

5. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES PROTEICOS DE PIM2 EN LINFOCITOS B MONOCLONALES Y LA RESPUESTA A PIM447

Tras evaluar la eficacia de PIM447 *in vitro* y *ex vivo* se analizó la expresión de la proteína PIM2 por Western blot en células B monoclonales a partir de muestras de sangre periférica de pacientes con LLC y donantes sanos, correlacionando los niveles proteicos con características clínicas y biológicas de la enfermedad. Con ello también se trató de buscar un potencial biomarcador que pudiera predecir la sensibilidad o resistencia al inhibidor de PIM quinasas en estudio.

Se evaluaron 18 muestras de distintos individuos: 3 controles sanos; 7 linfocitos B monoclonales (LBM); 12 LLC estables (LLCe); 10 LLC activas (LLCa) y 4 LLC en recaída tras tratamiento previo (LLCr). Se observó que los niveles de expresión de PIM2 fueron significativamente mayores en linfocitos B monoclonales de pacientes con LLC activa o en recaída, en comparación con pacientes con LLC estable ($p < 0,001$), (Figura 5. 9). Además, aquellos

pacientes con linfocitos B monoclonales con IGVH no mutado, y por tanto con peor pronóstico, también mostraron niveles más altos de PIM2 ($p = 0,01$), (Figura 5. 10). Asimismo se compararon los niveles de PIM2 entre pacientes pertenecientes a los distintos estadios de Binet, observándose que los linfocitos B monoclonales de pacientes con estadio C y B (estadios más avanzados) fueron más elevados comparados con aquellos pacientes en estadio A o los controles sanos ($p < 0.05$), (Figura 5. 11). Finalmente, se estudió si las muestras con niveles altos de PIM2 eran más resistentes al tratamiento con PIM447. Aunque las muestras con niveles más altos fueron ligeramente más resistentes en comparación con las muestras con niveles de PIM2 más bajas, la diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 5. 12).

Figura 5. 9 Comparación de los niveles de PIM2 en linfocitos B monoclonales de LLC en distintos estadios de la enfermedad (n= 36)

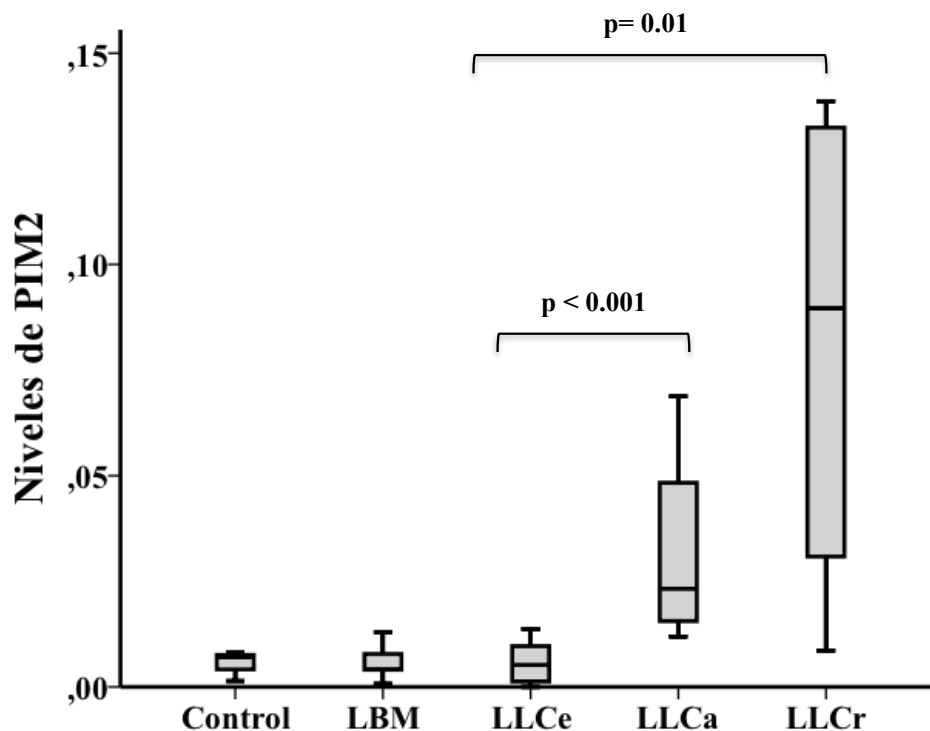


Figura 5. 10 Comparación de niveles de PIM2 en linfocitos B monoclonales con mutación o sin mutación de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (n= 33)

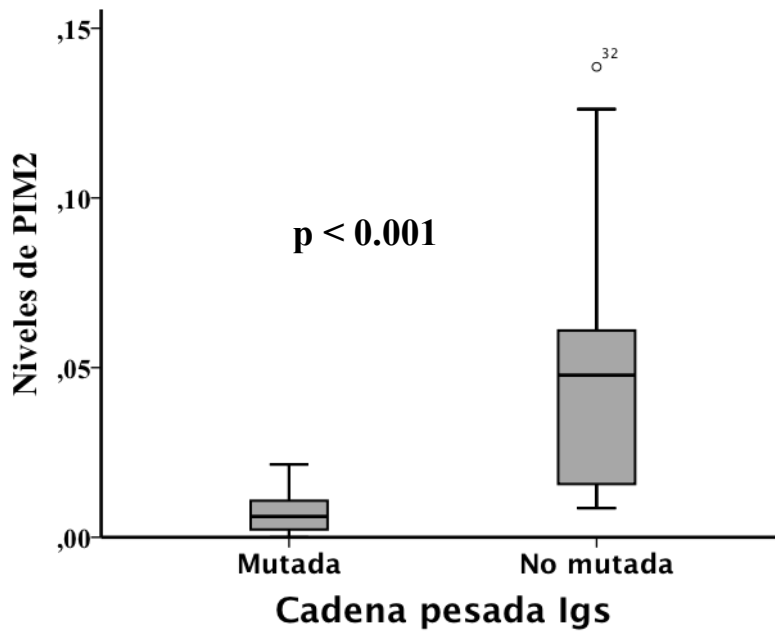


Figura 5. 11 Niveles de PIM2 en pacientes con diferente estadio de Binet

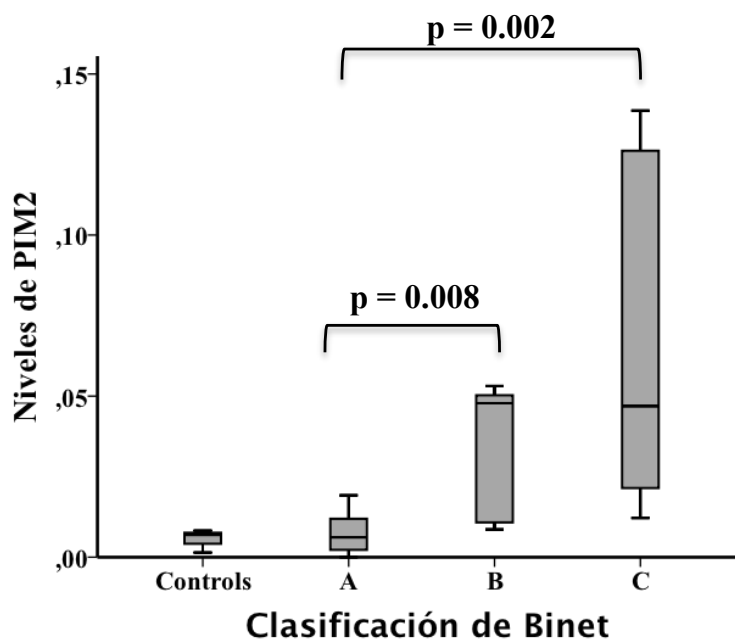
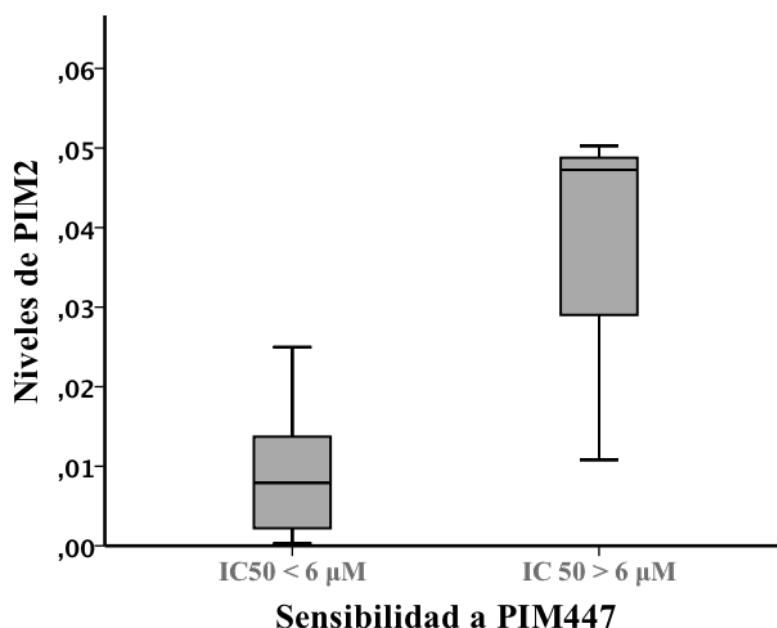


Figura 5. 12 Niveles de proteína PIM2 y sensibilidad al tratamiento con PIM447 (n=12)



6. EFICACIA DE PIM447 EN LLC. DISCUSIÓN.

La LLC es una enfermedad muy heterogénea con pacientes que pueden no precisar tratamiento y mantener una esperanza de vida similar al resto de la población, mientras que otros pacientes presentan una rápida progresión de la enfermedad, con mala respuesta a los tratamientos existentes.

Antes del desarrollo de la quimio-inmunoterapia el tratamiento de la LLC se basaba en el uso de agentes alquilantes como el clorambucilo.²¹⁶ Fueron los estudios *in vitro* que identificaron la sinergia entre la fludarabina (F) y la ciclofosfamida (C)²¹⁷ los que dieron paso al desarrollo de un nuevo esquema terapéutico, FC,²¹⁸ con repuestas globales $\geq 80\%$ aunque solo con un 35% de respuestas completas en pacientes previamente no tratados, mejorando los datos obtenidos con clorambucilo. La aparición del rituximab (R) en 1997 condujo al inicio de la quimioinmunoterapia. Se trataba de un

anticuerpo monoclonal quimérico dirigido frente a la proteína de membrana CD20 específica de los linfocitos B, que permitió dar un nuevo paso en el tratamiento de esta neoplasia. Se decidió entonces evaluar un nuevo esquema, el FCR²¹⁹ en pacientes no tratados previamente, comunicándose excelentes resultados con respuestas globales del 95% y respuestas completas del 70%. El ensayo fase III CLL8²²⁰ que comparó los esquemas FC vs FCR dio clara ventaja al último, con una supervivencia libre de enfermedad de 56.8 meses para FCR *versus* 32.9 meses para FC (*hazard ratio*, 0.59; 95%, intervalo de confianza, 0.50–0.69, $p < 0.001$). Desde entonces FCR se ha convertido en el estándar de tratamiento en pacientes con LLC de nuevo diagnóstico menores de 65 años y sin comorbilidades destacables. No obstante, la toxicidad del régimen con neutropenias grado 3-4 y frecuentes complicaciones infecciosas que obligan en muchas ocasiones a discontinuar el tratamiento, y la baja eficacia en pacientes con delección 17q, delección de 11q y IGHV no mutado,²²¹ han obligado a continuar investigando nuevos esquemas terapéuticos. Otros esquemas como el rituximab-bendamustina (RB) han demostrado también ser eficaces en esta neoplasia con datos de supervivencia libre de progresión similares a los obtenidos con FCR en pacientes mayores de 65 años y en aquellos con IGHV no mutado, aunque con datos de eficacia bastante inferiores cuando hablamos de pacientes más jóvenes. Pero el verdadero avance y novedad en el tratamiento de esta neoplasia son las nuevas moléculas orales ibrutinib e idealisib (inhibidor de fosfatidilinositol-3 quinasa, PI3K),^{222,223} que actúan inhibiendo el receptor quinasa de la célula B (BCR). Ambas son moléculas con una posología fácil y con una toxicidad muy manejable, que han irrumpido con fuerza en el nuevo panorama del tratamiento de la LLC. Ibrutinib es un inhibidor irreversible de la tirosina kinasa de Bruton (BTK) que ha demostrado eficacia significativa en LLC en recaída, incluyendo pacientes con del(17p).²²³ Aunque aún son limitados los datos la eficacia en pacientes con LLC no tratada previamente, parecen ser incluso mejores que en pacientes en recaída-refractarios.²²⁴

En nuestro caso, PIM447 es una molécula oral y la diana terapéutica a la que inhibe también se ha correlacionado con la supervivencia de la célula tumoral de la LLC. Puesto que otros estudios ya publicados habían analizado

el mecanismo de acción de moléculas similares *in vitro* en el caso de la LLC y como ya hemos mencionado también nuestro grupo en el caso del MM, decidimos realizar la investigación con linfocitos B patológicos de pacientes *ex vivo*.

En conclusión, hemos determinado que PIM447 es eficaz en líneas celulares de LLC *in vitro*, pero sobre todo es interesante que también resulta eficaz en linfocitos B patológicos de pacientes con LLC, manteniendo un buen perfil de toxicidad. Atendiendo a los estudios de sinergia, la combinación con fludarabina presentó buenos índices de combinación. Por último, las correlaciones de los niveles de PIM2 con distintos factores pronóstico, así como con diferentes estadios evolutivos de la enfermedad, han mostrado que los niveles de PIM2 son más altos en linfocitos monoclonales B de pacientes con características de mal pronóstico y en estadios más avanzados. También destacar que aunque todos los pacientes parecen sensibles a PIM447 y no se han encontrado diferencias significativas *ex vivo*, sería necesario profundizar en el estudio de los niveles de PIM2 como marcador de sensibilidad ya sea con un mayor número de muestras o con el estudio dentro de un ensayo clínico.

En definitiva, estos estudios podrían servir de base para realizar ensayos clínicos en pacientes con LLC con factores de mal pronóstico y refractarios a tratamiento.

DISCUSIÓN FINAL

Aunque cada capítulo del presente trabajo contiene su propia discusión, se ha considerado conveniente incluir aquí unos párrafos finales donde se pongan en contexto todos los resultados obtenidos.

Las neoplasias hematológicas son un conjunto heterogéneo de enfermedades clonales. El conocimiento sobre las bases biológicas de estas neoplasias ha avanzado mucho durante los últimos años, lo que ha permitido aumentar el arsenal terapéutico para su tratamiento. Esto se ha reflejado en un aumento en la supervivencia de los pacientes en algunos casos, como en el MM, y también en una mejora en la tolerancia y comodidad de los tratamientos, como en el caso de los nuevos fármacos orales en la LLC. No obstante, estos avances no siempre han repercutido de igual manera en el tratamiento de las distintas neoplasias hematológicas. De hecho el profundo avance en el conocimiento molecular de las LMA, a pesar de haber evolucionado enormemente solo ha desembocado en complejas clasificaciones de la enfermedad, sin haberse traducido en apenas cambios en el esquema terapéutico utilizado desde hace 40 años, a excepción del caso de la leucemia prolinfocítica aguda (LPA).

Con el objetivo de aproximar los datos experimentales, sobre potenciales tratamientos eficaces, a la práctica médica diaria, este trabajo de investigación se ha centrado en la evaluación preclínica de distintas moléculas en diversas neoplasias hematológicas. Como ya se ha comentado, aunque los procesos neoplásicos hematológicos son muy heterogéneos, existen determinadas proteínas, rutas y procesos metabólicos, necesarios para la supervivencia de la célula tumoral, que son comunes a todas estas enfermedades y cuyo conocimiento puede contribuir al desarrollo de fármacos con una sólida base biológica para su uso. En esta Tesis doctoral se ha partido de esta base y se ha intentado explorar la potencial actividad de nuevos fármacos dirigidos contra estas proteínas, rutas o procesos comunes de las células tumorales, a través de estudios *in vitro* en líneas celulares, *ex vivo* en células de pacientes e *in vivo* en distintos modelos murinos. También se ha buscado la sinergia con otras drogas con eficacia ya conocida y se ha investigado la base de esta sinergia al inhibir simultáneamente varias vías de supervivencia de la célula tumoral.

Dentro de los distintos estudios realizados en esta tesis doctoral, cabe destacar aquellos dedicados a los fármacos inductores de daño en el ADN, como EDO-S101 o zalypsis. Estos fármacos inductores de daño al ADN han demostrado su utilidad en enfermedades tan diversas como el MM o la LMA. En el caso concreto del MM, este tipo de fármacos han tenido históricamente una particular importancia en su tratamiento. En una época donde los fármacos tienden a dirigirse frente a dianas terapéuticas específicas, los agentes alquilantes y otros agentes inductores de daño al ADN parecen no estar aún desterrados del tratamiento del MM. De hecho fue un alquilante, el melfalán, el primer fármaco en ser usado con éxito en el tratamiento de esta neoplasia. Aunque el primer caso de MM fue descrito en la literatura moderna en 1845,²²⁵ no aparecieron datos sobre su tratamiento hasta la llegada de la radioterapia, que se utilizó durante años con escaso éxito. Posteriormente, Blokhin y cols. reportaron resultados favorables con la mostaza l-fenilamina (melfalán) y en 1962, Bergsagel y cols.²²⁶ confirmaron esos datos informando de la inducción de remisiones en aproximadamente un tercio de los pacientes con mieloma. Desde entonces, el melfalán se ha mantenido como el *gold standard* del tratamiento del MM, hasta la aparición nuevos agentes como el bortezomib o los IMiDs.

En este trabajo de investigación se ha demostrado la eficacia preclínica en MM de un nuevo agente alquilante con un mecanismo particular, como es EDO-S101, y se ha confirmado el papel de zalypsis, en este caso en combinación con bortezomib y dexametasona, en MM. Los datos expuestos en esta Tesis apoyan el papel que este mecanismo juega en el tratamiento del MM, y la importancia de seguir utilizando estos agentes terapéuticos, sobre todo en combinación. A lo largo de la historia terapéutica del MM son numerosos los estudios que han demostrado la eficacia de esquemas terapéuticos que combinan varios fármacos, atacando distintas vías de supervivencia de la célula tumoral. Este trabajo de investigación además de demostrar la eficacia de las combinaciones, destaca la sinergia existente entre la inhibición del proteosoma y la inducción de daño sobre el ADN, como se demuestra para las combinaciones de EDO-S101 o de zalypsis con bortezomib. Por otro lado, y también en consonancia con lo anterior, este trabajo demuestra que la inhibición simultánea de otra vía de

supervivencia, como es la de reparación del daño al ADN, en el caso de EDO-S101, estaría contribuyendo a la muerte de la célula tumoral.

Respecto a la LMA, ya se ha comentado que a pesar del avance en el conocimiento sobre las bases moleculares de esta enfermedad, esta circunstancia no se ha reflejado en una clara mejora o cambio en los esquemas de tratamiento utilizados en la actualidad. En nuestro caso se ha investigado la eficacia preclínica en LMA de un inhibidor del proteasoma, MLN-9708, y del agente bifuncional, EDO-S101, con efecto alquilante e inhibidor de HDAC. Ambos fármacos demostraron eficacia *in vitro* en líneas celulares de LMA. Además, en los estudios de MLN-9708 se demostró sinergia con fludarabina, aunque no se profundizó más en esa línea de investigación, ya que se priorizó el estudio de eficacia de EDO-S101 en LMA, por lo novedoso de la molécula en aquel momento. Sin embargo, ni los estudios de combinación de EDO-S101 *in vitro*, ni el estudio en monoterapia en un modelo murino de LMA arrojaron datos de eficacia suficientes para justificar la continuación del estudio. Dadas las múltiples variantes que presenta esta enfermedad, no debemos descartar sin embargo, que otros esquemas terapéuticos combinando distintos fármacos o el uso de otras líneas celulares o modelos animales, puedan demostrar eficacia en esta neoplasia.

En el caso de la LLC, las importantes novedades acontecidas en el conocimiento de la enfermedad durante los últimos años, han permitido detectar numerosas rutas metabólicas clave, en la supervivencia del linfocito tumoral. El receptor BCR del linfocito B es la diana terapéutica más novedosa, y su inhibición con ibrutinib e idelalisib, la última estrategia terapéutica en esta neoplasia. Estas moléculas, orales, han demostrado ser eficaces en pacientes hipertratados y de mal pronóstico. Además, la utilidad en combinación y en primera línea está siendo objeto de estudio en la actualidad, con prometedores resultados preliminares. Pero otras vías oncogénicas han sido reconocidas como relevantes en la patogénesis y en la evolución de la LLC y de otros SLP-B, como es el caso de la ruta de las PIM quinasas. En esta tesis se mencionan varios trabajos que consideran a estas proteínas una diana terapéutica clave en la LLC; y de hecho así lo confirman nuestros estudios de eficacia con el pan inhibidor de PIM quinasas, PIM447,

en numerosas muestras de pacientes con LLC en distintos estadios y con diferentes factores pronóstico. Además se trata de una molécula con un perfil de toxicidad muy favorable, según demuestran nuestros estudios *ex vivo* y que presenta sinergia con algunos fármacos utilizados en la práctica clínica en la LLC, por lo que sería una molécula tributaria de ser evaluada en ensayos clínicos en esta enfermedad como ya lo está siendo en otros SLP-B como el MM.

Aunque la eficacia de una droga en un modelo preclínico de neoplasias hematológicas, ya sean líneas celulares o modelos murinos, no siempre va a representar de forma fidedigna su utilidad en la clínica, se trata del primer paso hacia una aproximación terapéutica que puede mejorar la calidad y la esperanza de vida del enfermo. De hecho, la dicotomía existente entre lo logrado en el laboratorio y lo conseguido en el paciente, aunque puede deberse en parte a la falta de modelos preclínicos robustos, también depende de manera muy importante de la comunicación existente entre la clínica y la preclínica, lo que en inglés se denominaría *from bench to bedside* (“del laboratorio a la cabecera del enfermo”). Se trata de un concepto que está calando en todas las ramas de la medicina, especialmente en el campo de la oncología, la llamada medicina traslacional. De esta manera todos los estudios realizados en este trabajo de investigación se han hecho con el objetivo de sentar las bases científicas de futuros ensayos clínicos de los que los pacientes se puedan beneficiar.

No obstante, no debemos olvidar que no siempre todos los experimentos realizados en el laboratorio van a ser un éxito ni van a demostrar la eficacia buscada y anhelada. De la importancia de comunicar también esos datos fallidos, de publicar los datos sobre aquellos fármacos o combinaciones que no resultan eficaces también se encarga la investigación preclínica, y aunque actualmente estos datos parecen no tener cabida en la literatura científica actual, se trata de información valiosa que también debería ser reconocida en el ámbito científico, no solo para evitar que otros grupos realicen investigaciones sobre temas ya evaluados, sino que analizados detenidamente puedan aportar información sobre la naturaleza y comportamiento de la enfermedad en estudio.

CONCLUSIONES FINALES

1. Se ha establecido un modelo preclínico de estudio de la eficacia y mecanismo de actuación de nuevos agentes antitumorales y sus combinaciones en diversas neoplasias hematológicas.
2. El nuevo inhibidor de proteasomas, **MLN-9708 (Ixazomib)**, ha mostrado ser eficaz en líneas celulares de varias neoplasias hematológicas *in vitro* y sinergia con fludarabina en leucemia mieloide aguda.
3. **EDO-S101** se compone de una molécula de bendamustina, junto con un radical inhibidor de deacetilasas de histonas, y se ha demostrado que mantiene tanto sus propiedades alquilantes como de inhibición de deacetilasas de histonas.
4. **EDO-S101** presenta una potente eficacia preclínica en mieloma múltiple, a través de la inducción de daño al ADN y de una inhibición de los mecanismos de reparación de ese daño.
5. Se ha demostrado que la combinación de EDO-S101 y bortezomib ha demostrado ser sinérgica *in vitro* e *in vivo* en mieloma múltiple.
6. En referencia a **EDO-S101** en leucemia mieloblástica aguda (LMA), aunque se ha observado la eficacia *in vitro* del fármaco en líneas celulares de LMA, esta eficacia no ha podido ser probada en el modelo murino de LMA con las dosis, esquema y línea celular utilizados. Tampoco hemos observado un efecto sinérgico relevante con los fármacos anti-leucemia evaluados.
7. La combinación **zalypsis + bortezomib + dexametasona** ha demostrado sinergia y eficacia en modelos preclínicos de mieloma múltiple, y con un buen perfil de toxicidad.

8. La combinación zalypsis + bortezomib + dexametasona ejerce su acción *in vitro* principalmente mediante la inducción de daño sobre el ADN e inhibiendo la traslocación de NF- κ B al núcleo y por tanto su activación.
9. El inhibidor de PIM quinasas, **PIM447**, es eficaz *ex vivo*, en muestras de pacientes con LLC, con un buen perfil de toxicidad *ex vivo*.
10. Los niveles de la proteína PIM2, están más elevados en pacientes con LLC con factores de mal pronóstico y podrían representar un potencial biomarcador de respuesta a PIM447.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391-405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127(20):2375-90. doi:10.1182/blood-2016-01-643569.
3. Zhan F, Sawyer J, Tricot G. The role of cytogenetics in myeloma. *Leukemia* 2006;20(9):1484-6. doi:10.1038/sj.leu.2404330.
4. Drach J, Ackermann J, Fritz E, et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 1998;92(3):802-809. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9680348>. Accessed February 5, 2016.
5. Chang H, Qi C, Yi Q-L, Reece D, Stewart AK. P53 Gene Deletion Detected By Fluorescence in Situ Hybridization Is an Adverse Prognostic Factor for Patients With Multiple Myeloma Following Autologous Stem Cell Transplantation. *Blood* 2005;105(1):358-60. doi:10.1182/blood-2004-04-1363.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA. Cancer J. Clin.* 2015;65(1):5-29. doi:10.3322/caac.21254.
7. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. 2015;111(5):2516-2521. doi:10.1182/blood-2007-10-116129.An.
8. Ocio EM, Richardson PG, Rajkumar S V, et al. New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia* 2014;28(3):525-542. doi:10.1038/leu.2013.350.
9. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2005;352(8):804-15. doi:10.1056/NEJMra041720.
10. Cramer P, Langerbeins P, Eichhorst B, Hallek M. Advances in first-line treatment of chronic lymphocytic leukemia: Current recommendations on management and first-line treatment by the German CLL Study

- Group (GCLLSG). *Eur. J. Haematol.* 2016;96(1):9-18. doi:10.1111/ejh.12678.
11. Itchaki G, Brown JR. The potential of venetoclax (ABT-199) in chronic lymphocytic leukemia. *Ther. Adv. Hematol.* 2016;7(5):270-287. doi:10.1177/2040620716655350.
 12. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391-2406. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.The.
 13. Longo DL, Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2015;373(12):1136-1152. doi:10.1056/NEJMra1406184.
 14. Craig CM, Schiller GJ. Acute myeloid leukemia in the elderly: conventional and novel treatment approaches. *Blood Rev.* 2008;22(4):221-34. doi:10.1016/j.blre.2008.03.002.
 15. HAUT A, ALTMAN SJ, CARTWRIGHT GE, WINTROBE MM. The influence of chemotherapy on survival in acute leukemia. *Blood* 1955;10(9):875-95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13250034>. Accessed June 19, 2016.
 16. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;106(4):1154-63. doi:10.1182/blood-2005-01-0178.
 17. Yates JW, Wallace HJ, Ellison RR, Holland JF. Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemother. Rep.* 57(4):485-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4586956>. Accessed June 19, 2016.
 18. Rai KR, Holland JF, Glidewell OJ, et al. Treatment of acute myelocytic leukemia: a study by cancer and leukemia group B. *Blood* 1981;58(6):1203-12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6946847>. Accessed June 19, 2016.
 19. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet (London,*

- England) 2006;368(9550):1894-907. doi:10.1016/S0140-6736(06)69780-8.
20. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy improves survival in older patients with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2012;30(32):3924-31. doi:10.1200/JCO.2012.42.2964.
 21. Fischer T, Stone RM, Deangelo DJ, et al. Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3. *J. Clin. Oncol.* 2010;28(28):4339-45. doi:10.1200/JCO.2010.28.9678.
 22. Kerr JF, Wyllie a H, Currie a R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-247. doi:10.1038/bjc.1972.33.
 23. Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 2008;27(50):6507-6521. doi:10.1038/onc.2008.315.
 24. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267(5203):1456-1462. doi:10.1126/science.7878464.
 25. Schimmer AD. Induction of apoptosis in lymphoid and myeloid leukemia. *Curr. Oncol. Rep.* 2006;8(6):430-436. doi:10.1007/s11912-006-0071-z.
 26. Rowan S, Fisher DE. Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia* 1997;11(4):457-465.
 27. Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H, Toge T. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis: The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2002;50(5):343-352. doi:10.1007/s00280-002-0522-7.
 28. Krahling S, Callahan MK, Williamson P, Schlegel R a. Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Cell Death Differ.* 1999;6(2):183-189. doi:10.1038/sj.cdd.4400473.

29. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84(5):1415-20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8068938>.
30. de Bruin EC, Medema JP. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat. Rev.* 2008;34(8):737-749. doi:10.1016/j.ctrv.2008.07.001.
31. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path - A mini-review. *Gerontology* 2008;54(2):92-99. doi:10.1159/000129697.
32. Ashwell S, Zabludoff S. DNA damage detection and repair pathways-recent advances with inhibitors of checkpoint kinases in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 2008;14(13):4032-4037. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5138.
33. Olson SY, Garbán HJ. Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 2008;19(2):170-176. doi:10.1016/j.niox.2008.04.005.
34. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2005;37(11):719-727. doi:10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x.
35. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281(5381):1305-1308. doi:10.1126/science.281.5381.1305.
36. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N. Engl. J. Med.* 1996;334(26):1717-25. doi:10.1056/NEJM199606273342607.
37. Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat. Cell Biol.* 2000;2(August):553-555. doi:10.1038/35019596.
38. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell Death: Critical Control Points. *Cell* 2004;116(2):205-219. doi:10.1016/S0092-8674(04)00046-7.
39. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2002;2(9):647-656. doi:10.1038/nrc883.

40. Wilkinson JC, Wilkinson AS, Scott FL, Csomos RA, Salvesen GS, Duckett CS. Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs): A caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. *J. Biol. Chem.* 2004;279(49):51082-51090. doi:10.1074/jbc.M408655200.
41. Sun XM, Bratton SB, Butterworth M, MacFarlane M, Cohen GM. Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J. Biol. Chem.* 2002;277(13):11345-11351. doi:10.1074/jbc.M109893200.
42. Wu G, Chai J, Suber TL, et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 2000;408(6815):1008-12. doi:10.1038/35050012.
43. Candé C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J. Cell Sci.* 2002;115(Pt 24):4727-34. doi:10.1242/jcs.00210.
44. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001;412(6842):95-99. doi:10.1038/35083620.
45. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific Proteolytic Cleavage of Poly(ADP-ribose) Polymerase: An Early Marker of Chemotherapy-induced Apoptosis. *Cancer Res.* 1993;53(17):3976-3985.
46. Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* 2004;25(5):259-264. doi:10.1016/j.tips.2004.03.005.
47. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, et al. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 2012;45(6):487-498. doi:10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x.
48. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* 2014;24(1):9-23. doi:10.1038/cr.2013.169.
49. Suzuki K, Akioka M, Kondo-Kakuta C, Yamamoto H, Ohsumi Y. Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 2013;126(Pt 11):2534-2544. doi:10.1242/jcs.122960 [pii].

50. Wang SY, Yu QJ, Zhang RD, Liu B. Core signaling pathways of survival/death in autophagy-related cancer networks. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011;43(9):1263-1266. doi:10.1016/j.biocel.2011.05.010.
51. Dong Z, Liang S, Hu J, Jin W, Zhan Q, Zhao K. Autophagy as a target for hematological malignancy therapy. *Blood Rev.* 2016;30(5):369-380. doi:10.1016/j.blre.2016.04.005.
52. Kundu M, Thompson C. Autophagy: basic principles and relevance to disease. *Annu Rev Pathol* 2008;3:427-455. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.2.010506.091842 [doi].
53. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* 2000;150(6):1507-1513. doi:10.1083/jcb.150.6.1507.
54. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, et al. Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1 – Atg13 – FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol. Biol. Cell* 2009;20(7):1981-1991. doi:10.1091/mbc.E08.
55. Liu B, Cheng Y, Liu Q, Bao JK, Yang J-MM. Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta Pharmacol. Sin.* 2010;31(9):1154-64. doi:10.1038/aps.2010.118.
56. Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, et al. DRAM, a p53-Induced Modulator of Autophagy, Is Critical for Apoptosis. *Cell* 2006;126(1):121-134. doi:10.1016/j.cell.2006.05.034.
57. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011;18(4):571-80. doi:10.1038/cdd.2010.191.
58. Williams GH, Stoeber K. Cell cycle markers in clinical oncology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007;19(6):672-9. doi:10.1016/j.ceb.2007.10.005.
59. Blagosklonny M V, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* 1(2):103-10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429916>. Accessed June 19, 2016.
60. Tyson JJ, Novak B. Temporal organization of the cell cycle. *Curr. Biol.* 2008;18(17):R759-R768. doi:10.1016/j.cub.2008.07.001.
61. Malumbres M, Carnero A. Cell cycle deregulation: a common motif in

- cancer. *Prog. Cell Cycle Res.* 2003;5:5-18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14593696>. Accessed June 19, 2016.
62. Golubnitschaja O. Cell cycle checkpoints: the role and evaluation for early diagnosis of senescence, cardiovascular, cancer, and neurodegenerative diseases. *Amino Acids* 2007;32(3):359-71. doi:10.1007/s00726-006-0473-0.
63. Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 2004;116(2):221-34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744433>. Accessed June 19, 2016.
64. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004;18(2):189-218. doi:10.1038/sj.leu.2403241.
65. Malumbres M, Hunt SL, Sotillo R, et al. Driving the cell cycle to cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003;532:1-11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12908544>. Accessed June 19, 2016.
66. Møller MB. P27 in cell cycle control and cancer. *Leuk. Lymphoma* 2000;39(1-2):19-27. doi:10.3109/10428190009053535.
67. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999;13(12):1501-12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10385618>. Accessed June 19, 2016.
68. Hallstrom TC, Nevins JR. Balancing the decision of cell proliferation and cell fate. *Cell Cycle* 2009;8(4):532-5. doi:10.4161/cc.8.4.7609.
69. Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 2008;27(50):6507-21. doi:10.1038/onc.2008.315.
70. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008;7(12):979-87. doi:10.1038/nrd2656.
71. Coutts AS, La Thangue N. The p53 response during DNA damage:

- impact of transcriptional cofactors. *Biochem. Soc. Symp.* 2006;(73):181-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16626298>. Accessed June 19, 2016.
72. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp. Cell Res.* 1999;246(2):280-9. doi:10.1006/excr.1998.4319.
 73. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408(6810):307-10. doi:10.1038/35042675.
 74. Lodé L, Eveillard M, Trichet V, et al. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica* 2010;95(11):1973-6. doi:10.3324/haematol.2010.023697.
 75. Chng WJ, Price-Troska T, Gonzalez-Paz N, et al. Clinical significance of TP53 mutation in myeloma. *Leukemia* 2007;21(3):582-584. doi:10.1038/sj.leu.2404524.
 76. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003;101(11):4569-75. doi:10.1182/blood-2002-10-3017.
 77. Drach J, Ackermann J, Fritz E, et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 1998;92(3):802-809. doi:10.1038/320084a0.
 78. Teoh PJ, Chng WJ. p53 abnormalities and potential therapeutic targeting in multiple myeloma. *Biomed Res. Int.* 2014;2014:717919. doi:10.1155/2014/717919.
 79. Elnenaei MO, Gruszka-Westwood AM, A'Hernt R, et al. Gene abnormalities in multiple myeloma; the relevance of TP53, MDM2, and CDKN2A. *Haematologica* 2003;88(5):529-37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12745272>. Accessed June 19, 2016.
 80. Chou T. Multiple Myeloma: Recent Progress in Diagnosis and Treatment. *J. Clin. Exp. Hematop.* 2012;52(3):149-159. doi:10.3960/jslrt.52.149.
 81. Xiong W, Wu X, Starnes S, et al. An analysis of the clinical and biologic significance of TP53 loss and the identification of potential novel

- transcriptional targets of TP53 in multiple myeloma. *Blood* 2008;112(10):4235-46. doi:10.1182/blood-2007-10-119123.
82. Chang H, Qi C, Yi Q-L, Reece D, Stewart AK. p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Blood* 2005;105(1):358-60. doi:10.1182/blood-2004-04-1363.
 83. Zenz T, Kröber A, Scherer K, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008;112(8):3322-9. doi:10.1182/blood-2008-04-154070.
 84. Zenz T, Häbe S, Denzel T, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 2009;114(13):2589-97. doi:10.1182/blood-2009-05-224071.
 85. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J. Clin. Oncol.* 2001;19(5):1405-13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230485>. Accessed June 19, 2016.
 86. Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2008;22(8):1539-41. doi:10.1038/leu.2008.143.
 87. David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 2007;447(7147):941-950. doi:10.1038/nature05978.
 88. Nospikel T. DNA repair in mammalian cells: Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* 2009;66(6):994-1009. doi:10.1007/s00018-009-8737-y.
 89. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell*

- Biol.* 2006;7(5):335-46. doi:10.1038/nrm1907.
90. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)*. 2008;7(10):1765-71. doi:10.1016/j.dnarep.2008.06.018.
 91. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*. 2008;18(1):134-147. doi:10.1038/cr.2007.111.
 92. Lin Y, Lukacsovich T, Waldman AS. Multiple pathways for repair of DNA double-strand breaks in mammalian chromosomes. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19(12):8353-60. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84924&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 93. Williams RS, Williams JS, Tainer J a. Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem. Cell Biol.* 2007;85(4):509-520. doi:10.1139/O07-069.
 94. Borde V, Cobb J. Double functions for the Mre11 complex during DNA double-strand break repair and replication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009;41(6):1249-1253. doi:10.1016/j.biocel.2008.12.013.
 95. Matsuoka S, Ballif B a, Smogorzewska A, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science (80-)*. 2007;316(May):1160-1166. doi:10.1126/science.1140321.
 96. Huang M, Miao Z-H, Zhu H, Cai Y-J, Lu W, Ding J. Chk1 and Chk2 are differentially involved in homologous recombination repair and cell cycle arrest in response to DNA double-strand breaks induced by camptothecins. *Mol. Cancer Ther.* 2008;7(6):1440-9. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-2116.
 97. Galm O, Herman JG, Baylin SB. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev.* 2006;20(1):1-13. doi:10.1016/j.blre.2005.01.006.
 98. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, et al. DNA Methylation Signatures Identify Biologically Distinct Subtypes in Acute Myeloid Leukemia.

- Cancer Cell* 2010;17(1):13-27. doi:10.1016/j.ccr.2009.11.020.
99. Claus R, Lucas DM, Stilgenbauer S, et al. Quantitative DNA methylation analysis identifies a single CpG dinucleotide important for ZAP-70 expression and predictive of prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2012;30(20):2483-91. doi:10.1200/JCO.2011.39.3090.
 100. Sharma A, Heuck CJ, Fazzari MJ, et al. DNA methylation alterations in multiple myeloma as a model for epigenetic changes in cancer. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2(6):654-69. doi:10.1002/wsbm.89.
 101. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 2007;128(4):693-705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005.
 102. Weichert W. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett.* 2009;280(2):168-176. doi:10.1016/j.canlet.2008.10.047.
 103. Stimson L, Wood V, Khan O, Fotheringham S, La Thangue NB. HDAC inhibitor-based therapies and haematological malignancy. *Ann. Oncol.* 2009;20(8):1293-302. doi:10.1093/annonc/mdn792.
 104. Gkatzamanidou M, Shammam M, Sanchez JM, et al. HDAC8 Mediates Homologous Recombination and Cytoskeleton Integrity in Myeloma with Potential Impact on Cell Growth and Survival. *Blood* 2014;124(21):Abstract 416.
 105. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 2002;417(6887):455-458. doi:10.1038/417455a.
 106. Catley L, Weisberg E, Kiziltepe T, et al. Aggresome induction by proteasome inhibitor bortezomib and alpha-tubulin hyperacetylation by tubulin deacetylase (TDAC) inhibitor LBH589 are synergistic in myeloma cells. *Blood* 2006;108(10):3441-9. doi:10.1182/blood-2006-04-016055.
 107. Maruta H, Greer K, Rosenbaum JL. The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J. Cell Biol.* 1986;103(2):571-9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2113826&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed March 31, 2016.
 108. Lawrie CH. MicroRNAs in hematological malignancies. *Blood Rev.*

- 2013;27(3):143-154. doi:10.1016/j.blre.2013.04.002.
109. Hide1. Hideshima T, Hideshima T, Richardson P, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 2001;61(7):3071-3076. Available at: <Go to ISI>://00016796 T, Hideshima T, Richardson P, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 2001;61(7):3071-3076.
 110. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, et al. NF- B as a Therapeutic Target in Multiple Myeloma. *J. Biol. Chem.* 2002;277(19):16639-16647. doi:10.1074/jbc.M200360200.
 111. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2004;4(5):361-370. doi:10.1038/nrc1360.
 112. Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2009;9(1):28-39. doi:10.1038/nrc2559.
 113. Gallogly MM, Lazarus HM. Midostaurin: an emerging treatment for acute myeloid leukemia patients. *J. Blood Med.* 2016;7:73-83. doi:10.2147/JBM.S100283.
 114. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2007;7(4):295-308. doi:10.1038/nrc2109.
 115. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2003;3(1):11-22. doi:10.1038/nrc969.
 116. Shima F, Matsumoto S, Yoshikawa Y, Kawamura T, Isa M, Kataoka T. Current status of the development of Ras inhibitors. *J. Biochem.* 2015;158(2):91-9. doi:10.1093/jb/mvv060.
 117. Sebti SM. Protein farnesylation: Implications for normal physiology, malignant transformation, and cancer therapy. *Cancer Cell* 2005;7(4):297-300. doi:10.1016/j.ccr.2005.04.005.
 118. Wymann MP, Pirola L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 1998;1436(1-2):127-150. doi:10.1016/S0005-2760(98)00139-8.

119. Stein RC. Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment. In: *Endocrine-Related Cancer*. Vol 8.; 2001:237-248. doi:10.1677/erc.0.0080237.
120. Vivanco I, Sawyers C. The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. - Cancer* 2002;2(7):489-501. doi:10.1038/nrc839.
121. Gills JJ, Dennis PA. Perifosine: update on a novel Akt inhibitor. *Curr. Oncol. Rep.* 2009;11(2):102-10. doi:10.1007/s11912-009-0016-4.
122. Keane NA, Glavey S V, Krawczyk J, O'Dwyer M. AKT as a therapeutic target in multiple myeloma. *Expert Opin. Ther. Targets* 2014;18(8):897-915. doi:10.1517/14728222.2014.924507.
123. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2013;149(2):274-293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.mTOR.
124. Cornu M, Albert V, Hall MN. MTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2013;23(1):53-62. doi:10.1016/j.gde.2012.12.005.
125. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(8):671-688. doi:10.1038/nrd2062.
126. Zhou H-Y, Huang S-L. Current development of the second generation of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Chin. J. Cancer* 2012;31(1):8-18. doi:10.5732/cjc.011.10281.
127. Briscoe J, Guschin D, Rogers NC, et al. JAKs, STATs and signal transduction in response to the interferons and other cytokines. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1996;351(1336):167-171. doi:10.1098/rstb.1996.0013.
128. Sehgal PB. STAT-signalling through the cytoplasmic compartment: Consideration of a new paradigm. *Cell. Signal.* 2000;12(8):525-535. doi:10.1016/S0898-6568(00)00098-X.
129. Starr R, Hilton DJ. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays* 1999;21(1):47-52. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199901)21:1<47::AID-BIES6>3.0.CO;2-N.
130. Quintás-Cardama A. The role of Janus kinase 2 (JAK2) in

- myeloproliferative neoplasms: Therapeutic implications. *Leuk. Res.* 2013;37(4):465-472. doi:10.1016/j.leukres.2012.12.006.
131. Benekli M, Baumann H, Wetzler M. Targeting signal transducer and activator of transcription signaling pathway in leukemias. *J. Clin. Oncol.* 2009;27(26):4422-32. doi:10.1200/JCO.2008.21.3264.
 132. Brault L, Menter T, Obermann EC, et al. PIM kinases are progression markers and emerging therapeutic targets in diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Cancer* 2012;107(3):491-500. doi:10.1038/bjc.2012.272.
 133. Wang Z, Bhattacharya N, Weaver M, et al. Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. *J. Vet. Sci.* 2001;2:167-179.
 134. Brault L, Gasser C, Bracher F, Huber K, Knapp S, Schwaller J. Pim serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. *Haematologica* 2010;95(6):1004-1015. doi:10.3324/haematol.2009.017079.
 135. Decker S, Finter J, Forde A, et al. PIM kinases are essential for chronic lymphocytic leukemia cell survival (PIM2/3) and CXCR4 mediated microenvironmental interactions (PIM1). *Mol. Cancer Ther.* 2014. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0575-T.
 136. Chen LS, Redkar S, Bearss D, Wierda WG, Gandhi V. Pim kinase inhibitor, SGI-1776, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2009;114:4150-4157. doi:10.1182/blood-2009-03-212852.
 137. Kupperman E, Lee EC, Cao Y, et al. Evaluation of the Proteasome Inhibitor MLN9708 in Preclinical Models of Human Cancer. *Cancer Res* 2010;70(5):1970-1980. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2766.
 138. Kumar SK, Bensinger WI, Zimmerman TM, et al. Phase 1 study of weekly dosing with the investigational oral proteasome inhibitor ixazomib in relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood* 2014;124(7):1047-55. doi:10.1182/blood-2014-01-548941.
 139. Richardson PG, Baz R, Wang M, et al. Phase 1 study of twice-weekly dosing of investigational oral proteasome inhibitor ixazomib in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood* 2014;124(7):1038-1046. doi:10.1182/blood-2014-01-548826.

140. Kumar SK, Berdeja JG, Niesvizky R, et al. Safety and tolerability of ixazomib, an oral proteasome inhibitor, in combination with lenalidomide and dexamethasone in patients with previously untreated multiple myeloma: an open-label phase 1/2 study. *Lancet. Oncol.* 2014;15(13):1503-12. doi:10.1016/S1470-2045(14)71125-8.
141. Moreau P, Masszi T, Grzasko N, et al. Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(17):1621-34. doi:10.1056/NEJMoa1516282.
142. Colado E, Paíno T, Maiso P, et al. Zalypsis has in vitro activity in acute myeloid blasts and leukemic progenitor cells through the induction of a DNA damage response. *Haematologica* 2011;96(5):687-95. doi:10.3324/haematol.2010.036400.
143. Ocio EM, Maiso P, Chen X, et al. Zalypsis: a novel marine-derived compound with potent antimyeloma activity that reveals high sensitivity of malignant plasma cells to DNA double-strand breaks. *Blood* 2009;113(16):3781-91. doi:10.1182/blood-2008-09-177774.
144. Knop S, Straka C, Haen M, Schwedes R, Hebart H, Einsele H. The efficacy and toxicity of bendamustine in recurrent multiple myeloma after high-dose chemotherapy. *Haematologica* 2005;90:1287-1288.
145. Ludwig H, Kasparu H, Leitgeb C, et al. Bendamustine-bortezomib-dexamethasone is an active and well-tolerated regimen in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood* 2014;123:985-991. doi:10.1182/blood-2013-08-521468.
146. Pönisch W, Andrea M, Wagner I, et al. Successful treatment of patients with newly diagnosed/untreated multiple myeloma and advanced renal failure using bortezomib in combination with bendamustine and prednisone. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2012;138:1405-1412. doi:10.1007/s00432-012-1212-4.
147. Berenson JR, Yellin O, Bessudo A, et al. Phase I/II trial assessing bendamustine plus bortezomib combination therapy for the treatment of patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 2013;160:321-330. doi:10.1111/bjh.12129.
148. Pönisch W, Heyn S, Beck J, et al. Lenalidomide, bendamustine and prednisolone exhibits a favourable safety and efficacy profile in relapsed

- or refractory multiple myeloma: Final results of a phase 1 clinical trial OSHO - #077. *Br. J. Haematol.* 2013;162:202-209. doi:10.1111/bjh.12361.
149. Lentzsch S, O'Sullivan A, Kennedy RC, et al. Combination of bendamustine, lenalidomide, and dexamethasone (BLD) in patients with relapsed or refractory multiple myeloma is feasible and highly effective: results of phase 1/2 open-label, dose escalation study. *Blood* 2012;119:4608-4613. doi:10.1182/blood-2011-12-395715.
 150. Pönisch W, Rozanski M, Goldschmidt H, et al. Combined bendamustine, prednisolone and thalidomide for refractory or relapsed multiple myeloma after autologous stem-cell transplantation or conventional chemotherapy: Results of a Phase I clinical trial. *Br. J. Haematol.* 2008;143:191-200. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07076.x.
 151. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer* 2001;1:194-202. doi:10.1038/35106079.
 152. Weber DM, Graef T, Hussein M, et al. Phase I trial of vorinostat combined with bortezomib for the treatment of relapsing and/or refractory multiple myeloma. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* 2012;12:319-324. doi:10.1016/j.clml.2012.07.007.
 153. Siegel DS, Richardson P, Dimopoulos M, et al. Vorinostat in combination with lenalidomide and dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2014;4:e182. doi:10.1038/bcj.2014.1.
 154. Ocio EM, Vilanova D, Atadja P, et al. In vitro and in vivo rationale for the triple combination of panobinostat (LBH589) and dexamethasone with either bortezomib or lenalidomide in multiple myeloma. *Haematologica* 2010;95(5):794-803. doi:10.3324/haematol.2009.015495.
 155. San-Miguel JF, Richardson PG, Günther A, et al. Phase Ib study of panobinostat and bortezomib in relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 2013;31:3696-3703. doi:10.1200/JCO.2012.46.7068.
 156. Cai B, Lyu H, Huang J, et al. Combination of bendamustine and entinostat synergistically inhibits proliferation of multiple myeloma cells

- via induction of apoptosis and DNA damage response. *Cancer Lett.* 2013;335:343-350. doi:10.1016/j.canlet.2013.02.046.
157. Blanco-Aparicio C, Carnero A. Pim kinases in cancer: Diagnostic, prognostic and treatment opportunities. *Biochem. Pharmacol.* 2013;85(5):629-643. doi:10.1016/j.bcp.2012.09.018.
158. Grundler R, Brault L, Gasser C, et al. Dissection of PIM serine/threonine kinases in FLT3-ITD-induced leukemogenesis reveals PIM1 as regulator of CXCL12-CXCR4-mediated homing and migration. *J. Exp. Med.* 2009;206(9):1957-70. doi:10.1084/jem.20082074.
159. Paíno T, García-Gómez A, González-Méndez L, et al. The novel pan-PIM kinase inhibitor, PIM447, displays dual anti-myeloma and bone protective effects, and potently synergizes with current standards of care. *Clin. Cancer Res.* 2016:clincanres.0230.2016. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0230.
160. Phase 1 Study Update of the Novel Pan-Pim Kinase Inhibitor LGH447 in Patients with Relapsed/ Refractory Multiple Myeloma. Available at: <https://ash.confex.com/ash/2014/webprogram/Paper69283.html>. Accessed October 28, 2015.
161. Greenstein S, Krett NL, Kurosawa Y, et al. Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: A model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and -resistant MM cells. *Exp. Hematol.* 2003;31:271-282. doi:10.1016/S0301-472X(03)00023-7.
162. Ma MH, Yang HH, Parker K, et al. The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents. *Clin. Cancer Res.* 2003;9:1136-1144.
163. Chen Q, Van Der Sluis PC, Boulware D, Hazlehurst LA, Dalton WS. The FA/BRCA pathway is involved in melphalan-induced DNA interstrand cross-link repair and accounts for melphalan resistance in multiple myeloma cells. *Blood* 2005;106:698-705. doi:10.1182/blood-2004-11-4286.
164. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.

165. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, et al. Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood* 2006;107(3):1092-1100. doi:10.1182/blood-2005-03-1158.
166. Garcia-Gomez A, Ocio EM, Crusoe E, et al. Dasatinib as a bone-modifying agent: Anabolic and anti-resorptive effects. *PLoS One* 2012;7(4). doi:10.1371/journal.pone.0034914.
167. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 1995;9(13):1277-1287. doi:10.1016/S0294-3506(98)80078-1.
168. Chauhan D, Anderson KC. Apoptosis in multiple myeloma: Therapeutic implications. *Apoptosis* 2001;6(1-2):47-55. doi:10.1023/A:1009620027205.
169. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72(1-2):248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
170. Olive PL, Banáth JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* 2006;1(1):23-29. doi:10.1038/nprot.2006.5.
171. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Res.* 2010;70:440-446. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
172. Gentalen ET, Proctor JM. Using the Peggy Simple Western system for fine needle aspirate analysis. *Methods Mol. Biol.* 2015;1219:139-55. doi:10.1007/978-1-4939-1661-0_11.
173. Rustandi RR, Anderson C, Hamm M. Application of capillary electrophoresis in glycoprotein analysis. *Methods Mol. Biol.* 2013;988:181-97. doi:10.1007/978-1-62703-327-5_11.
174. Chauhan D, Tian Z, Zhou B, et al. In Vitro and In Vivo Selective Antitumor Activity of a Novel Orally Bioavailable Proteasome Inhibitor MLN9708 against Multiple Myeloma Cells. *Clin. Cancer Res.* 2011;17(16):5311-5321. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0476.
175. Lee EC, Fitzgerald M, Bannerman B, et al. Antitumor activity of the investigational proteasome inhibitor MLN9708 in mouse models of B-

- cell and plasma cell malignancies. *Clin. Cancer Res.* 2011;17(23):7313-7323. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0636.
176. Colado E, Paino T, Maiso P, et al. Zalypsis has in vitro activity in acute myeloid blasts and leukemic progenitor cells through the induction of a DNA damage response. *Haematologica* 2011;96(5):687-95. doi:10.3324/haematol.2010.036400.
 177. Teoh PJ, Chung TH, Sebastian S, et al. P53 Haploinsufficiency and Functional Abnormalities in Multiple Myeloma. *Leukemia* 2014;28(10):2066-74. doi:10.1038/leu.2014.102.
 178. Chen X, Wong P, Radany EH, Stark JM, Laulier C, Wong JYC. Suberoylanilide Hydroxamic Acid as a Radiosensitizer through Modulation of RAD51 Protein and Inhibition of Homology-Directed Repair in Multiple Myeloma. *Mol. Cancer Res.* 2012;10(August):1052-1064. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0587.
 179. Kachhap SK, Rosmus N, Collis SJ, et al. Downregulation of homologous recombination DNA repair genes by HDAC inhibition in prostate cancer is mediated through the E2F1 transcription factor. *PLoS One* 2010;5(6). doi:10.1371/journal.pone.0011208.
 180. Konstantinopoulos P a, Wilson AJ, Saskowski J, Wass E, Khabele D. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhances olaparib activity by targeting homologous recombination DNA repair in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2014:1-8. doi:10.1016/j.ygyno.2014.03.007.
 181. Mateos M-V, Oriol A, Rosiñol L, et al. Bendamustine, bortezomib and prednisone for the treatment of patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of a prospective phase 2 Spanish/PETHEMA trial. *Haematologica* 2015;100(8):1096-102. doi:10.3324/haematol.2015.124818.
 182. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, et al. *Bortezomib plus Melphalan and Prednisone for Initial Treatment of Multiple Myeloma.*; 2008. doi:10.1056/NEJMoa0801479.
 183. Sanchez E, Shen J, Steinberg J, et al. The histone deacetylase inhibitor LBH589 enhances the anti-myeloma effects of chemotherapy in vitro and in vivo. *Leuk. Res.* 2011;35(3):373-379. doi:10.1016/j.leukres.2010.06.026.

184. Fernández-Rodríguez C, Salar A, Navarro A, et al. Antitumor activity of the combination of bendamustine with vorinostat in diffuse large B-cell lymphoma cells. *Leuk. Lymphoma* 2015;1-25. doi:10.3109/10428194.2015.1063143.
185. Berenson JR, Hilger JD, Yellin O, et al. A phase 1/2 study of oral panobinostat combined with melphalan for patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Ann. Hematol.* 2014;93(1):89-98. doi:10.1007/s00277-013-1910-2.
186. Chesi M, Garbitt V, Bergsagel PL. Identification of Novel Therapeutic Targets in the Clinically Predictive Vk*MYC Mouse Model of Multiple Myeloma. *Blood* 2014;124(21):Abstract 415. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/415.abstract>. Accessed June 4, 2016.
187. Chesi M, Matthews GM, Garbitt VM, et al. Drug response in a genetically engineered mouse model of multiple myeloma is predictive of clinical efficacy. *Blood* 2012;120(2):376-85. doi:10.1182/blood-2012-02-412783.
188. Chesi M, Garbitt V, Bergsagel PL. Identification of novel therapeutic targets in the clinically predictive Vk*MYC mouse model of multiple myeloma. *Blood* 2014;124(21).
189. Khalil H, Tummala H, Chakarov S, Zhelev N, Lane D. Targeting ATM pathway for therapeutic intervention in cancer. *BioDiscovery* 2012;Volume 1. doi:10.7750/BioDiscovery.2012.1.3.
190. Matsuoka S, Rotman G, Ogawa a, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000;97(19):10389-10394. doi:10.1073/pnas.190030497.
191. Gatei M, Sloper K, Sørensen C, et al. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* 2003;278(17):14806-14811. doi:10.1074/jbc.M210862200.
192. Jurkin J, Zupkovitz G, Lager S, et al. Distinct and redundant functions of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 in proliferation and

- tumorigenesis. *Cell Cycle* 2011;10(3):406-12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3115015&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed January 4, 2016.
193. Mateos MV, Richardson PG, Schlag R, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone compared with melphalan and prednisone in previously untreated multiple myeloma: Updated follow-up and impact of subsequent therapy in the phase III VISTA trial. *J. Clin. Oncol.* 2010;28(13):2259-2266. doi:10.1200/JCO.2009.26.0638.
 194. Mateos MV, Hernández JM, Hernández MT, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: Results of a multicenter phase 1/2 study. *Blood* 2006;108(7):2165-2172. doi:10.1182/blood-2006-04-019778.
 195. Asklund T, Kvarnbrink S, Holmlund C, et al. Synergistic killing of glioblastoma stem-like cells by bortezomib and HDAC inhibitors. *Anticancer Res.* 2012;32:2407-2413. doi:32/7/2407 [pii].
 196. Nawrocki ST, Carew JS, Pino MS, et al. Aggresome disruption: a novel strategy to enhance bortezomib-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66(7):3773-81. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2961.
 197. S.D. B, E.G. A, A.C. S, et al. FLAG-IDA has significant activity as frontline induction or salvage therapy for patients with high risk and/or relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2014;124(21):no pagination. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/5285%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed16&NEWS=N&AN=71757206>.
 198. Ossenkoppele GJ, Graveland WJ, Sonneveld P, et al. The value of fludarabine in addition to ARA-C and G-CSF in the treatment of patients with high-risk myelodysplastic syndromes and AML in elderly patients. *Blood* 2004;103(8):2908-2913. doi:10.1182/blood-2003-07-2195.
 199. Lichtman MA. A historical perspective on the development of the cytarabine (7days) and daunorubicin (3days) treatment regimen for acute myelogenous leukemia: 2013 the 40th anniversary of 7+3. *Blood Cells, Mol. Dis.* 2013;50(2):119-130. doi:10.1016/j.bcmed.2012.10.005.

200. Wiernik PH. FLT3 inhibitors for the treatment of acute myeloid leukemia. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 2010;8(6):429-436, 444.
201. Jabbour EJ, Estey E, Kantarjian HM. Adult acute myeloid leukemia. *Mayo Clin. Proc.* 2006;81(2):247-60. doi:10.4065/81.2.247.
202. Maiso P, Colado E, Ocio E, et al. The synergy of panobinostat plus doxorubicin in acute myeloid leukemia suggests a role for HDAC inhibitors in the control of DNA repair. *Leukemia* 2009;23:2265-2274. doi:10.1038/leu.2009.182.
203. Ocio EM, Maiso P, Chen X, et al. Zalypsis: a novel marine-derived compound with potent antimyeloma activity that reveals high sensitivity of malignant plasma cells to DNA double-strand breaks. *Blood* 2009;113(16):3781-3791. doi:10.1182/blood-2008-09-177774.
204. Ocio EM, Oriol A, Bladé J, et al. Phase I/II study of weekly PM00104 (Zalypsis[®]) in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 2015;104(Mm):n/a-n/a. doi:10.1111/bjh.13515.
205. López-Iglesias A-A, González-Méndez L, San-Segundo L, et al. Synergistic DNA-damaging effect in multiple myeloma with the combination of zalypsis, bortezomib and dexamethasone. *Haematologica* 2016. doi:10.3324/haematol.2016.146076.
206. Poltz R, Naumann M. Dynamics of p53 and NF-κB regulation in response to DNA damage and identification of target proteins suitable for therapeutic intervention. *BMC Syst. Biol.* 2012;6:125. doi:10.1186/1752-0509-6-125.
207. Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat. Med.* 2005;11:725-730. doi:10.1038/nm1263.
208. Cann KL, Hicks GG. Regulation of the cellular DNA double-strand break response. *Biochem. Cell Biol.* 2007;85(6):663-674. doi:10.1139/O07-135.
209. Neri P, Ren L, Gratton K, et al. Bortezomib-induced "BRCAness" sensitizes multiple myeloma cells to PARP inhibitors. *Blood* 2011;118(24):6368-6379. doi:10.1182/blood-2011-06-363911.
210. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003;101(11):4569-4575. doi:10.1182/blood-2002-10-3017.

211. Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an I κ B α /NF- κ B Complex. *Cell* 1998;95(6):749-758. doi:10.1016/S0092-8674(00)81698-0.
212. Yu S-W, Wang H, Poitras MF, et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002;297(5579):259-263. doi:10.1126/science.1072221.
213. Hertlein E, Beckwith KA, Lozanski G, et al. Characterization of a new chronic lymphocytic leukemia cell line for mechanistic in vitro and in vivo studies relevant to disease. *PLoS One* 2013;8(10):e76607. doi:10.1371/journal.pone.0076607.
214. Melo J V, Brito-Babapulle V, Foroni L, Robinson DS, Luzzatto L, Catovsky D. Two new cell lines from B-prolymphocytic leukaemia: characterization by morphology, immunological markers, karyotype and Ig gene rearrangement. *Int. J. cancer* 1986;38(4):531-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3093393>. Accessed March 25, 2016.
215. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, et al. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk. Res.* 1999;23(2):127-36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10071128>. Accessed March 25, 2016.
216. Knospe WH, Loeb V, Huculey CM. Bi-weekly chlorambucil treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1974;33(2):555-562.
217. Yamauchi T, Nowak BJ, Keating MJ, Plunkett W. DNA repair initiated in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by 4-hydroperoxycyclophosphamide is inhibited by fludarabine and clofarabine. *Clin. Cancer Res.* 2001;7(11):3580-3589. doi:10.1056/nejm199805213382104.
218. O'Brien SM, Kantarjian HM, Cortes J, et al. Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2001;19(5):1414-1420.
219. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2005;23(18):4079-4088. doi:10.1200/JCO.2005.12.051.

220. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010;376(9747):1164-1174. doi:10.1016/S0140-6736(10)61381-5.
221. Fink A, Busch R, Pflug N, et al. 4.19 Prediction of Poor Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients treated with FCR (Fludarabine, Cyclophosphamide, Rituximab) in the CLL8 Trial of the German CLL Study Group. *CLML* 2011;11:S230. doi:10.1016/j.clml.2011.09.139.
222. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2014;370(11):997-1007. doi:10.1056/NEJMoa1315226.
223. Byrd JC, O'Brien S JD. Ibrutinib in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(13):1278-1279. doi:10.1056/NEJMc1309710.
224. O'Brien S, Furman RR, Coutre SE, et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: An open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(1):48-58. doi:10.1016/S1470-2045(13)70513-8.
225. Solly S. Remarks on the pathology of mollities ossium; with cases. *Med Chir Trans.* 1844;27:435-461.
226. Of AH, Cell H. Historical Review. 1999;(3):330-339. doi:10.1161/01.CIR.0000040594.96123.55.

)