

Carfilzomib: Nuevas Dianas Terapéuticas en el Tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda

Carfilzomib: New Therapeutic Targets in Acute Lymphoblastic Leukaemia's Treatment

Sofía Lorenzo Mañas, Carlos Martínez Macho, Ana Entrena Martínez
y Lidia Martínez Fernández de Sevilla

Tutora:

Ángeles Vicente López

Universidad Complutense de Madrid

Resumen

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) constituye la enfermedad maligna más común en la infancia y la principal causa de muerte en la población infantil. La aparición de resistencias y recaídas hacen imprescindible la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas contra esta enfermedad. El objetivo de este trabajo es el estudio de los efectos de un inhibidor del proteosoma de segunda generación, Carfilzomib, como posible tratamiento para la LLA, y su cotejo *in vitro* con los fármacos utilizados convencionalmente en la terapéutica. Los resultados del análisis muestran como Carfilzomib podría ser eficaz en el tratamiento de la LLA, pudiendo ser incorporado al arsenal terapéutico actual.

Palabras clave: leucemia linfoblástica aguda, Carfilzomib, PR-171, proteosoma.

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignant disease in childhood and the leading cause of death in the child population. The appearance of resistances and relapses make it imperative to search for new therapeutic targets against this disease. The objective of this work is the study of the effects of a second-generation proteasome inhibitor, Carfilzomib, as a possible treatment for ALL, and its *in vitro* comparison with the drugs conventionally used in therapeutics. The results of the analysis show how Carfilzomib could be effective in the treatment of ALL, and can be incorporated into the current therapeutic arsenal.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, Carfilzomib, PR-171, proteasome.

Trabajo presentado en las XII Jornadas Complutenses, XI Congreso Nacional de Investigación en Ciencias de la Salud para Alumnos Pregraduados y XVI Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas.

Esta investigación ha sido dirigida por la Dra. Ángeles Vicente López, Dpto. Biología Celular, y financiada por SAF2015-66986R y RD12/0019/0007.

Introducción

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más común en la infancia, constituyendo la causa de muerte más frecuente por enfermedad en la población infantil, debido a la recaída leucémica y/o a la refractariedad terapéutica (Belson, Kingsley y Holmes, 2006).

Gracias a los avances de las últimas décadas, los protocolos quimioterápicos están dando muy buenos resultados, con un índice de curación de un 85%. Sin embargo, no son tan favorables para aquellos pacientes que presentan una recaída, con tasas de supervivencia de entre 30-50% (Bhojwani y Pui, 2013).

Por este motivo resulta imprescindible la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas contra esta enfermedad. Entre ellas hay que destacar el proteosoma, un sistema de depuración de macromoléculas imprescindible en la homeostasis celular.

Éste es un complejo enzimático multicatalítico responsable de la degradación ubiquitina-dependiente de proteínas intracelulares. Entre sus sustratos encontramos proteínas mal plegadas, dañadas y proteínas de vida media corta que intervienen en cascadas de señalización relacionadas con la proliferación celular, la reparación del DNA y la diferenciación (Kortuem y Stewart, 2013).

Así, el desarrollo de inhibidores del proteosoma como el Bortezomib, ha supuesto un gran avance en la terapéutica de distintas enfermedades como el mieloma múltiple o el linfoma no Hodgkin, impulsando las investigaciones a su posible uso en otras enfermedades hematológicas malignas (Nooka, Gleason, Casbourne y Lonial, 2013).

Sin embargo, la aparición de resistencias a este fármaco, la inhibición inespecífica de otras Serín-proteasas y los efectos adversos derivados de su toxicidad, ha hecho imprescindible el estudio y aprobación de nuevos inhibidores de segunda generación (Nooka et al., 2013). En respuesta a esta demanda surgió Carfilzomib (PR-171) que inhibe irreversible y específicamente el proteosoma. Así, el efecto sobre las células tumorales reside en la no degradación de proteínas como ciclinas, inhibidores de CDK, inhibidores de NF- κ B y otras proteínas apoptóticas, reduciendo la proliferación celular, angiogénesis y favoreciendo la apoptosis (Fuchs, Pro-vaznikova, Marinov, Kuzelova y Spicka, 2009).

Objetivos

El objetivo de este trabajo es el estudio de los efectos de un inhibidor del proteosoma de segunda generación (Carfilzomib) como posible tratamiento para la LLA, y su cotejo *in vitro* con los fármacos utilizados convencionalmente en la terapéutica de esta enfermedad.

Material y métodos

1. Líneas leucémicas (Tabla 1).
2. Tratamiento con fármacos: Las líneas fueron cultivadas con dosis crecientes de los siguientes quimioterápicos: Metotrexato (Mx), Citarabina (Ct) y Carfilzomib (Cz).
3. Determinación de viabilidad: La población de células apoptóticas se definió, mediante citometría de flujo, como aquellas Anexina-V positivas dentro de una población ioduro de propidio (IP) negativa. La viabilidad de las células tras los cultivos fue determinada mediante tinción con colorante Trypan Blue y observación posterior con microscopio óptico.
4. Determinación de proliferación: La proliferación de las líneas leucémicas fue determinada mediante el Kit específico 5-Bromo-2-desoxy-uridina.

Resultados

Como se observa en Figura 1A, el número de células viables de la línea NALM-6 descendía de manera progresiva según aumentaban las concentraciones de cualquiera de los tres fármacos. En paralelo, el número de células apoptóticas se incrementó en todos los casos, alcanzándose con Cz a concentración de 0,5 nM un % de células apoptóticas similares a aquellas observadas con Mx y Ct a 0,25 μ M.

Respecto a TOM-1 (Figura 1B) se advierte que, tanto en viabilidad como en muerte celular, el fármaco Mx ejerce un menor efecto, trazando una curva con menor pendiente y estabilizándose sin alcanzar los umbrales a los que llegan Ct y Cz.

Tabla 1.
Relación de líneas leucémicas, inmunofenotipos y alteraciones genéticas.

Línea leucémica	Inmunofenotipo	Alteración genética
NALM-6	LLA pre-B	t(5;12)
TOM-1	LLA pre-B	t(9;22) BCR-ABL1
RS4;11	LLA pro-B	t(4;11) MLL-AFF1 (MLL-AF4)
REH	LLA B común	t(12;21) ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)

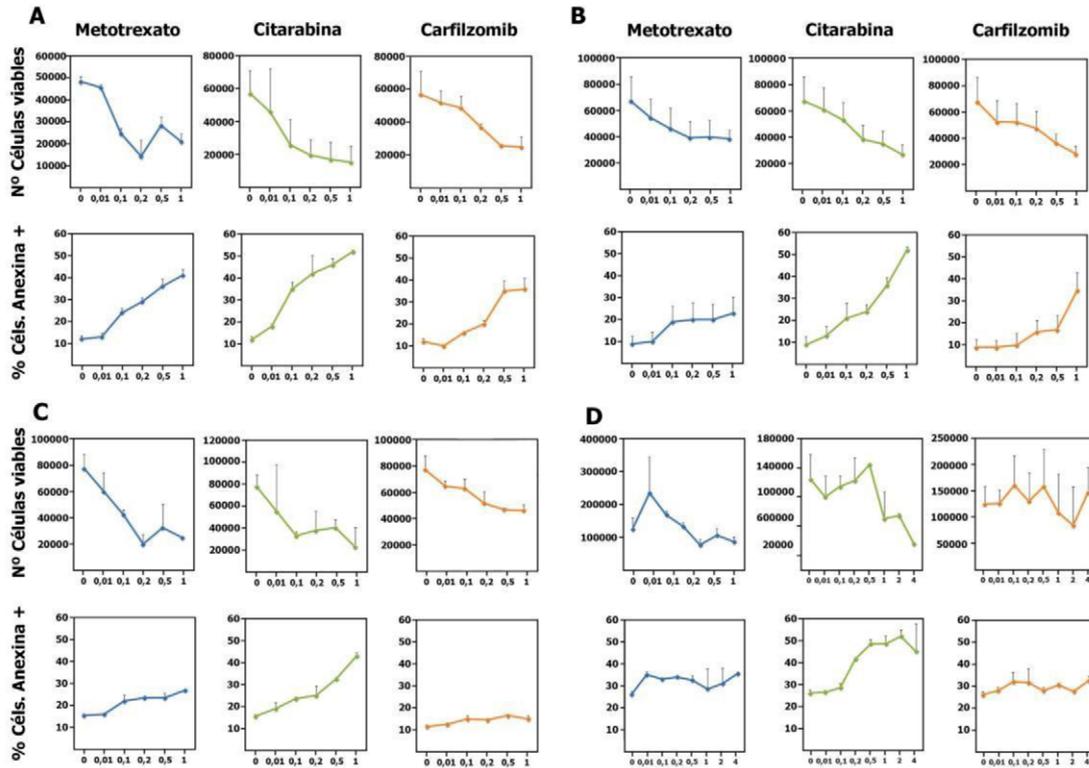


Figura 1. Número de células viables y % de células Annexina positivo de las líneas leucémicas B: NALM-6 (A), TOM-1 (B), RS4 (C) y REH (D) tras 24 h de cultivo con las diferentes dosis de cada uno de los fármacos. Las gráficas representan la media \pm desviación estándar de 4-6 experimentos independientes.

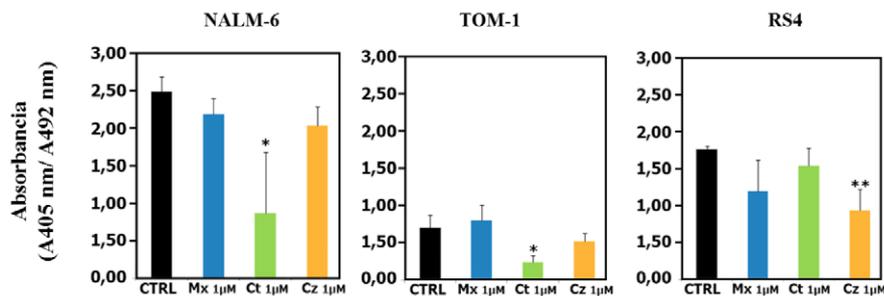


Figura 2. Proliferación de células leucémicas B NALM-6, TOM-1 y RS4 tras 24 h de cultivo con Mx y Ct a 1 μ M y Cz a 1nM, siguiendo el protocolo de BrdU. *= p <0.05; **= p <0.01.

En la línea RS4 (Figura 1C) se aprecia como en el caso de Mx, la caída de la viabilidad es muy pronunciada, en contraposición con su menor efecto en muerte celular. También resaltar como en esta línea, Cz consigue disminuir el número de células sin presentar un efecto notable en cuanto al porcentaje de anexinas positivas.

En la Figura 1D destaca la resistencia de la línea REH a la muerte celular inducida por Mx y Cz.

Como se muestra en la Figura 2, Ct redujo la proliferación en las líneas NALM6 y TOM-1, no siendo así en el caso de RS4, donde destaca el efecto antiproliferativo de Carfilzomib.

Discusión y conclusiones

Recientes estudios, como el realizado por Stapnes et al. en 2006, sugieren que el efecto antitumoral de los inhibidores del proteosoma no es específico del mieloma múltiple, pudiendo ser eficaces en otras células inmaduras malignas como los blastos de la LLA. Los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* en posteriores análisis como los proporcionados por Demo et al. en 2007, impulsaron el inicio de un estudio en Fase I de Carfilzomib como posible tratamiento para LLA (Wartman et al., 2016).

Este efecto antitumoral en LLA se reafirma con los re-

sultados obtenidos en el análisis de este trabajo. En él se ha observado como Cz alcanza valores semejantes a los de Ct y Mx en las líneas TOM-1 y NALM-6 y lo hace con dosis significativamente inferiores, del orden de 10^3 .

En las líneas RS4 y REH, Cz no ejerce prácticamente efecto en relación a la muerte celular. Sin embargo, sí se observa un descenso de la viabilidad tumoral en el caso de RS4, que podría explicarse por el efecto antiproliferativo mostrado en la BrdU. Así, podemos resaltar la acción de este fármaco sobre leucemias de alto riesgo, correspondientes a las líneas TOM-1 y RS4, donde resulta ventajoso frente a otros fármacos convencionales como el Mx, que no alcanza los resultados obtenidos con Cz.

Por todo lo anterior, podemos concluir que Carfilzomib puede ser un fármaco eficaz en la LLA incorporado al arsenal terapéutico actual, dotando a éste de una nueva diana celular complementaria a las ya establecidas por los fármacos convencionales.

Referencias

- Belson, M., Kingsley, B., & Holmes, A. (2006). Risk factors for acute leukemia in children: A review. *Environmental Health Perspectives*, 115(1), 138-145. <http://doi.org/10.1289/ehp.9023>
- Bhojwani, D., & Pui, C.-H. (2013). Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet Oncology*, 14(6), e205-e217. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70580-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70580-6)
- Demo, S. D., Kirk, C. J., Aujay, M. A., Buchholz, T. J., Dajee, M., & Ho, M. N. ... Bennett, N. K. (2007). Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Research*, 67(13), 6383-6391. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4086>
- Fuchs, O., Provaznikova, D., Marinov, I., Kuzelova, K., & Spicka, I. (2009). Antiproliferative and proapoptotic effects of proteasome inhibitors and their combination with histone deacetylase inhibitors on leukemia cells. *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets*, 9(1), 62-77. <http://doi.org/10.2174/187152909787581372>
- Kortuem, K. M., & Stewart, A. K. (2013). Carfilzomib. *Blood*, 121, 893-897. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-459883>
- Nooka, A., Gleason, C., Casbourne, D., & Lonial, S. (2013). Relapsed and refractory lymphoid neoplasms and multiple myeloma with a focus on carfilzomib. *Biologics: Targets & Therapy*, 7, 13-32. <http://doi.org/10.2147/btt.s24580>
- Stapnes, C., Døskeland, A. P., Hatfield, K., Ersvær, E., Rynningen, A., & Lorens, J. B., ... Bruserud, Ø. (2007). The proteasome inhibitors bortezomib and PR-171 have antiproliferative and proapoptotic effects on primary human acute myeloid leukaemia cells. *British Journal of Haematology*, 136(6), 814-828. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06504.x>
- Wartman, L. D., Fiala, M. A., Fletcher, T., Hawkins, E. R., Cashen, A., & DiPersio, J. F., ... Vij, R. (2016). A phase I study of carfilzomib for relapsed or refractory acute myeloid and acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 57(3), 728-730. <http://doi.org/10.3109/10428194.2015.1076930>