

TESIS DOCTORAL



EVALUACIÓN DEL EFECTO SINERGICO DEL INHIBIDOR DE LA "KINESIN SPINDLE PROTEIN" FILANESIB (ARRY-520) EN COMBINACIÓN CON FÁRMACOS INMUNOMODULADORES EN MODELOS PRECLÍNICOS DE MIELOMA MÚLTIPLE.

Departamento de Medicina

Hematología

**SUSANA HERNÁNDEZ GARCÍA
2018**



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,

Dña. Teresa Paíno Gómez, Doctora en Farmacia e Investigadora del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca,
como directores y,

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

CERTIFICAN:

Que el trabajo realizado bajo nuestra dirección y tutoría por Dña. Susana Hernández García titulado: *Evaluación del efecto sinérgico del inhibidor de las "kinesin spindle proteins" filanesib (ARRY-520) en combinación con fármacos inmunomoduladores en modelos preclínicos de mieloma múltiple*, 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 10 de mayo de 2018.

Fdo.

Dr. Enrique M. Ocio

Dra. Mercedes Garayoa

Dra. Teresa Paíno

Dr. Marcos González-Díaz

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada con las siguientes ayudas:

- Proyecto asociado al Instituto de Salud Carlos III – Fondo de Investigación Sanitaria (PI 15/0067)
- Proyecto asociado al Instituto de Salud Carlos III - Fondo de Investigación Sanitaria (PI 15/2156)
- Proyecto asociado a la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) (RD12/0036/0058)
- Proyecto asociado a la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), GCB120981SAN
- Proyecto asociado a la Gerencia Regional de Salud (GRS 1029/A/14)
- Proyecto asociado a la Gerencia Regional de Salud (GRS 1175/A/15)
- Proyecto asociado a la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (FIC335U14)

ABREVIATURAS

AAG: Alpha-1-acid glycoprotein.

AcMo: Anticuerpos monoclonales.

ACTG1: Actin Gamma 1.

ADCC: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.

ADCP: Antibody-dependent cellular phagocytosis.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

AIF: Apoptosis Inducing Factor.

Akt: v-akt murine thymoma viral oncogene.

Apaf-1: Apoptotic protease activating factor-1

APC/C: Anaphase Promoting Complex/Cyclosome.

APRIL: A Proliferation-inducing ligand.

APS: Ammonium persulfate.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNc: Ácido ribonucleico complementario.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

auto-TAPH: Trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas.

Bad: Bcl-2 antagonist of cell death.

BAFF: B cell activating factor.

Bak: Bcl-2 antagonist killer.

Bax: Bcl-2 associated-X protein.

Bcl-2: B cell lymphoma-2.

Bcl-6: B-cell lymphoma 6.

Bcl-xL: B cell lymphoma-extra large.

Bid: BH3 interacting domain death agonist.

Bim: Bcl-2 interacting protein.

BIRC2/3: Baculoviral inhibitor of apoptosis protein repeat-containing 2/3.

BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1.

BSA: Bovine serum albumin.

CAMDR: Cell adhesion-mediated drug resistance.

CARTs: Chimeric Antigen Receptor T cells.

CDC: Complement-dependent cytotoxicity.

CDK: Cyclin-dependent kinase.

c-MAF: Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog.

CME: células mesenquimales estromales.

CMEp: CME de pacientes.

CP: Célula plasmática.

Cul4A: Cullin 4A.

CXCR4: Chemokine (C-X-C motif) receptor 4.

CYLD: Cylindromatosis.

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

DD: Death Domain.

DDB1: Damage-specific DNA binding protein 1.

DED: Death Effector Domain.

DIOC6(3): 3,3'-Dihexyloxacarboyanine Iodide.

DISC: Death-Inducing Signalling Complex.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

E2F: Transcription factor E2F.

EDTA: Ethylenediaminetetracetic acid.

Elk: Ets-like transcription factor.

Endo-G: Endonucleasa-G.

Erk 1/2: Extracellular signal-regulated kinase-1/2.

Fa: fraction affected.

FADD: Fas Associated Death Domain.

FAM46C: Family with sequence similarity 46 member C.

FasL: Fas ligand.

FGFR3: Fibroblast growth factor receptor 3.

FLIP: FLICE-like inhibitory protein.

Fos: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene.

GEP: gene expression profiling.

GMSI: Gammapatía monoclonal de significado incierto.

Grb2/Sos: GTP-exchange complex growth factor receptor bound-2/son of sevenless exchange.

HDAC: Histone deacetylase.

HDACi: Histone deacetylase inhibitors.

Hsp90: Heat shock protein 90.

IAPs: inhibitor apoptosis proteins.

IC: índice de combinación.

IC₅₀: Inhibitory concentration 50.

ICAM1: Intercellular adhesion molecule 1.

IGF1: Insulin-like growth factor 1.

IGH: Heavy chain immunoglobulin.

Igs: Inmunoglobulinas.

IL6: Interleukin 6.

IMiD: Immunomodulatory drugs.

IMWG: Internacional Myeloma Working Group.

IP: Inhibidor del proteasoma.

JAK: Janus Kinase.

JNK: c-Jun Kinase.

Kd: dissociation constant.

KIF11: Kinesin Family Member 11.

KRAS: v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog.

KSP: Kinesin spindle protein.

LB: Linfocito B.

LFA1: Lymphocyte Function-Associated Antigen-1.

LSD1: lysine (K)-specific demethylase 1A.

MAPK: Mitogen-activated protein kinase.

Mcl-1: Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related).

MEK: MAP/ERK kinase.

MM: Mieloma multiple.

MMSET: Multiple myeloma SET domain protein containing protein type III.

MO: Médula ósea.

mTORC1: Mammalian target of rapamycin complex 1.

MTT: Methylthiazole tetrazolium.

MYC: v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog.

NCCD: Nomenclature Committe on Cell Death.

NFκB: Nuclear factor kappa B.

NK: Natural killer.

NRAS: Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog.

OB: osteoblastos.

OC: osteoclastos.

PARP: Poly (ADP-Ribose) Polymerase.

PBS: Phosphate buffered saline.

PD-1: Programmed cell death protein 1.

PD-L1: Programmed death-ligand 1.

PI3K: Phosphatidylinositol-3 kinase.

PIM: proto-oncogene proviral integration site for moloney murine leukemia virus.

PKC: Protein kinase C.

PMSF: Phenyl-methyl sulphonyl fluoride.

PRDM1: PR/SET domain 1.

PTEN: Phosphatase and tensin homolog.

PTP4A3: Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3.

PTPRZ1: Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polipeptide 1.

PVDF: Polyvinylidene fluoride.

RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma.

Ras: Rat sarcoma.

RB1: Retinoblastoma 1.

RC: Remisiones Completas.

SAC: Spindle assembly checkpoint.

SBF: Suero bovino fetal.

SDF1 α : Stromal cell-derived factor 1 α .

SDS: Sodium dodecyl sulphate.

SG: Supervivencia global.

Shc: Src homology 2 domain containing.

siRNA: Small Interfering RNA.

SLAMF7: Signaling lymphocytic activation molecule F7.

SLP: supervivencia libre de progresión.

Smac/Diablo: Second mitochondria-derived activator of caspase/ direct IAP-binding protein with low PI.

SOCS3: Suppressor of cytokine signaling 3.

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3.

STR: short tandem repeat.

TBST: Tris-buffered saline tween-20.

TEMED: Tetramethylethylenediamine.

TMA: Tissue microarrays.

TMRE: Tetramethylrhodamine ethyl ester.

TNF-R: Tumor Necrosis Factor Receptor.

TNF α : Tumor necrosis factor α .

TP53: Tumor protein p53.

TRADD: TNFR-associated death domain protein.

TRAF3: TNF receptor-associated factor 3/6.

TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand.

TRAIL-R: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor.

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

VCAM1: Vascular cell adhesion molecule 1.

VEGF: Vascular endothelial growth factor.

VEGFR1/2: Vascular endothelial growth factor receptor 1/2.

VLA4/5: Very Late Antigen 4/5.

WAF1: Wild-type p53-activated fragment 1.

XIAP: X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein.

XPO-1: Exportin 1.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

| | |
|--|-----------|
| 1. EL MIELOMA MÚLTIPLE (MM) | 2 |
| 1.1 GENERALIDADES | 2 |
| 1.2 PATOGENIA DEL MM | 5 |
| 2. MECANISMOS DE PROGRESIÓN TUMORAL | 22 |
| 2.1 MUERTE CELULAR | 22 |
| 2.2 EL CICLO CELULAR | 31 |
| 3. TRATAMIENTO DEL MM | 35 |
| 3.1 FÁRMACOS APROBADOS PARA EL TRATAMIENTO DEL MM | 39 |
| 3.2 NUEVOS AGENTES EN FASES DE DESARROLLO PARA EL TRATAMIENTO DEL MM | 47 |
| 4. FILANESIB EN EL MM | 52 |
| 4.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE FILANESIB EN EL MM | 52 |
| 4.2 FILANESIB EN LA CÍNICA DEL MM | 55 |
| 4.3 INFLUENCIA DE LA ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA HUMANA (AAG) SOBRE LA EFICACIA DE FILANESIB EN EL MM | 56 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 59 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 67 |

| | |
|---|------------|
| RESULTADOS | 99 |
| CAPITULO I.EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA EFICACIA Y MECANISMO DE ACCIÓN DE FILANESIB EN MIELOMA MÚLTIPLE | 101 |
| CAPITULO II. EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA EFICACIA Y MECANISMO DE ACCIÓN DE FILANESIB EN COMBINACIÓN CON POMALIDOMIDA Y DEXAMETASONA EN MIELOMA MÚLTIPLE | 135 |
| CAPITULO III. EVALUACIÓN PRECLÍNICA DEL REACTANTE DE FASE AGUDA ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA HUMANA (AAG) COMO POSIBLE BIOMARCADOR DE RESPUESTA EN EL MIELOMA MÚLTIPLE | 169 |
| DISCUSIÓN FINAL | 189 |
| CONCLUSIONES | 196 |
| BIBLIOGRAFÍA | 200 |
| ANEXOS | 229 |

INTRODUCCIÓN

1. EL MIELOMA MÚLTIPLE

1.2 . GENERALIDADES.

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células B clonales muy heterogénea desde el punto de vista clínico y molecular, caracterizada por la acumulación de células plasmáticas (CP) malignas en la médula ósea (MO). Las células mielomatosas secretan, en la mayoría de los casos, una inmunoglobulina de carácter monoclonal que puede ser detectada en suero y/u orina. Además, como consecuencia de su interacción con el microambiente de la MO, desencadenan un aumento de la actividad osteoclástica que se traduce en la presencia de lesiones óseas ¹⁻³. Otros síntomas característicos de la enfermedad son el dolor óseo asociado a las lesiones óseas, la hipercalcemia, la anemia, la insuficiencia renal y la inmunodeficiencia.

Dentro de las gammopatías monoclonales, entre las que se encuentra el MM existen varias entidades o estadios evolutivos. La GMSI o desconocido u oscuro (también llamadas gammopatías monoclonales esenciales o idiopáticas [MGUS, del inglés Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance]). Es un hallazgo muy frecuente en la clínica diaria ya que más del 1% de las personas mayores de 60 años tienen un componente monoclonal en suero. Lo normal es que el componente sea de pequeña cuantía y que se trate de una GMSI. Pero, pese a todo, hay que hacer el diagnóstico diferencial completo con el MM, pues la actitud terapéutica es totalmente distinta: las GMSI no requieren tratamiento, mientras que el MM puede que sí. Las GMSI se caracterizan porque la banda monoclonal en suero es <3 g/dl, la infiltración de médula ósea por plasmocitos es <10%, y no hay lesiones óseas. La Hb, la función renal, el calcio y la tasa de Ig policlonales son normales, y no hay síntomas atribuibles a la gammopatía. No obstante, requieren una vigilancia clínica por la posibilidad de evolucionar a MM (esto ocurre en un 1% por año).

El MM activo o que requiere tratamiento (anteriormente era llamado sintomático, pero este concepto se ha expandido recientemente) como se explica en la tabla 1.

Tabla 1. Criterios diagnósticos clásicos de mieloma múltiple (sintomático).

| MIELOMA MÚLTIPLE SINTOMÁTICO |
|--|
| – Componente monoclonal en suero y/u orina |
| – Presencia de células plasmáticas clonales en médula ósea o presencia de plasmocitoma probado por biopsia |
| – Sintomatología derivada de la afectación de órganos o tejidos por el mieloma (síntomas CRAB)* |

* Síntomas CRAB:

- **HiperCalcemia:** calcio corregido >11 mg/dl, o 1 mg/dl por encima de la normalidad.
- **Insuficiencia Renal:** creatinina >2 mg/dl o aclaramiento <40 ml/min.
- **Anemia:** Hb 2 g/dl por debajo del límite bajo de la normalidad o Hb <10 g/dl.
- **Bone lesions (lesiones óseas):** lesiones líticas en la serie ósea.

Además, recientemente se han propuesto tres nuevos criterios que apoyan el diagnóstico de mieloma múltiple activo y por tanto su tratamiento: la presencia de >60% de células plasmáticas en médula ósea, lesiones focales en la resonancia magnética y/o un cociente de cadenas ligeras libres en suero (cadena afectada/no afectada) >100 ⁴.

Una entidad intermedia sería el Mieloma quiescente (o smoldering) en que el componente monoclonal sérico es >3 g/dl y/o la infiltración de la médula ósea es $>10\%$ (aunque $<60\%$; ver párrafo anterior), pero no existe anemia, osteólisis, insuficiencia renal, hipercalcemia ni otros datos de mieloma múltiple activo como se ha indicado previamente. El problema de estos pacientes es el riesgo de progresión a MM. Clásicamente se ha considerado que no requieren tratamiento, sin embargo estudios más recientes, apoyan un tratamiento precoz en aquellos pacientes con MM quiescente con datos que predicen alto riesgo de progresión a MM sintomático o activo ⁵.

Epidemiológicamente, el MM es una enfermedad poco frecuente, con una incidencia de 3-5 casos/100.000 habitantes/año y, aunque es el segundo cáncer hematológico más frecuente tras el linfoma no-Hodgkin, sólo supone aproximadamente un 1,5% de todas las neoplasias y un 15% de las hemopatías malignas. Presenta gran variabilidad geográfica y racial, con mayor incidencia entre la población negra americana, y es más frecuente en varones. La edad media de los pacientes con MM en el momento del diagnóstico es de 69 años en varones y 71 en mujeres y aparece excepcionalmente antes de los 30 años de edad ⁶. La mediana de supervivencia ha pasado de 2-3 años en el siglo pasado ⁷ hasta superar los 7-8 años en la última década, principalmente debido a las mejoras en el conocimiento clínico de la enfermedad, a la introducción y al uso generalizado del trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas (auto-TAPH), y a los avances en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos ⁸.

El tratamiento del MM está definido en gran medida por la edad y por el estado general del paciente. Durante más de 30 años, el MM se ha basado únicamente en quimioterapia que combinaba fármacos alquilantes, como el melfalán, con esteroides. El principal inconveniente de estas terapias ha sido su inespecificidad. En los últimos años, se han descubierto, desarrollado y aprobado distintos agentes con mecanismos de acción específicos ⁹; entre ellos destacan aquellos que ya forman parte de los estándares de tratamiento para esta enfermedad y que han permitido mejorar la supervivencia de los pacientes con MM como los inhibidores del proteasoma (IP) bortezomib,

carfilzomib e ixazomib y los agentes inmunomoduladores (IMiD) talidomida, lenalidomida y más recientemente, la pomalidomida ¹⁰, que en combinación con dexametasona se ha consolidado como un tratamiento de elección en los mielomas refractarios. Además, recientemente se han aprobado nuevos agentes, también con mecanismos de acción específicos, como el inhibidor de histonas deacetilasas (HDACi), panobinostat, y los anticuerpos monoclonales (AcMo) daratumumab y elotuzumab que han supuesto una revolución en el tratamiento de esta enfermedad.

No obstante, y a pesar de estos avances, el MM sigue siendo una enfermedad incurable para la mayoría de los pacientes, debido a la aparición de refractariedad, en ocasiones primaria pero generalmente secundaria. Por ello, se precisa continuar la investigación de nuevos agentes que en monoterapia o más frecuentemente en combinación sean capaces de vencer las resistencias y mejorar la eficacia.

1.2. PATOGENIA DEL MIELOMA MÚLTIPLE.

1.2.1 Biología de la diferenciación de la célula B

La célula que predomina en la médula ósea de los pacientes con MM es la célula plasmática, que constituye el último estadio de la diferenciación linfocítica B. El conocimiento de la ontogenia de los linfocitos B es esencial para comprender el origen y desarrollo de la célula plasmática tumoral.

Los linfocitos B son los responsables de la inmunidad humoral y se originan a partir de células progenitoras linfocíticas que son células madre hematopoyéticas pluripotenciales. El receptor de antígenos de células B les permite reconocer y responder a los antígenos, desencadenando respuestas celulares de distintos tipos. La primera fase de diferenciación de los linfocitos B ocurre en la médula ósea. Sus precursores (células proB, preB y células B inmaduras) reordenan los genes que codifican para la cadena pesada y ligera del receptor para el antígeno de las células B, y posteriormente maduran en

los órganos linfoides secundarios, donde reconocen antígenos, proliferan y se diferencian a CP secretoras de anticuerpos.

Así, en la primera fase de diferenciación, el precursor más inmaduro del linfocito B (célula pro-B) inicia el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas (Igs). La inmunoglobulina es un tetrámero formado por dos cadenas ligeras idénticas (L, del inglés light) y dos cadenas pesadas idénticas (H, del inglés heavy) unidas entre sí y que constan de dos regiones principales: la región variable, responsable del reconocimiento del antígeno, y la región constante. En la síntesis de cada una de las cadenas participan varios segmentos de genes, de cuyo reordenamiento resultan los genes funcionales, responsables directos de la codificación de cada una de las cadenas de Igs. El reordenamiento comienza por las cadenas pesadas, que se localizan en el cromosoma 14, con el reordenamiento del segmento D con el J (DJH) y seguido de la reordenación del segmento V con el DJ (VDJH), dando lugar a una cadena pesada de inmunoglobulina completa. En este momento se activan una serie de genes (I5 y Vpreb) cuyo producto es una pseudocadena ligera, cuya única función es comprobar si la cadena pesada generada será capaz de acoplarse con una cadena ligera verdadera. Si no se supera este punto, la célula en diferenciación puede intentar un nuevo reordenamiento con el otro alelo y si no lo consigue estará destinada a la muerte por apoptosis.

Cuando la célula reordena con éxito la cadena pesada ésta se asocia con la pseudocadena ligera y se expresa como un prerreceptor en membrana; de este modo la célula alcanza el estadio de célula pre-B. La célula pre-B crece (célula pre-B grande) y prolifera dando lugar a una numerosa progenie de células pre-B pequeñas (pre-B II). En estas células se produce un proceso similar de reordenamiento génico pero esta vez con los genes que codifican para la cadena ligera. Primero se reordenan los segmentos V y J de un alelo del gen kappa (κ), localizados en el cromosoma 2, hasta conseguir una cadena ligera reordenada completa, que se puede asociar a la cadena pesada. Si el complejo pesada-ligera puede formarse, la célula detiene los reordenamientos,

pero si la cadena ligera formada no es capaz de asociarse a la pesada se producen sucesivos reordenamientos VJ con el mismo alelo. Si el fallo persiste se producen reordenamientos en el alelo alternativo del gen κ . Si tampoco éstos tienen éxito, se inician reordenamientos sucesivos en los alelos del gen lambda (λ), localizados en el cromosoma 22. En el momento en el que el reordenamiento se produce con éxito, la célula B expresa inmunoglobulina M (IgM) de membrana y se habla ya de célula B inmadura. Si esta célula B inmadura no reacciona con los antígenos presentes en la médula ósea, se transforma en una célula B madura, que sale a la periferia donde las células autorreactivas a antígenos periféricos serán también eliminadas. En caso de reaccionar con antígenos locales propios, las células pueden ser eliminadas (selección clonal) o pueden volver a intentar reordenar la cadena ligera (edición del receptor) con el fin de no reaccionar contra elementos propios y poder sobrevivir. Es en este punto donde concluye la primera fase de la diferenciación de la célula B. Los linfocitos B que superen esta selección son conocidos como linfocitos B vírgenes (o naïve), estos linfocitos pasan a coexpresar inmunoglobulina M e inmunoglobulina D (IgD) en su membrana y migran hacia los órganos linfoides secundarios a través de la sangre. Es aquí donde el linfocito B maduro entra en contacto con el antígeno. Cuando el linfocito B vírgen coloniza el folículo linfoide y entra en contacto con el antígeno origina las células blásticas que forman el centro germinal. Estas células blásticas proliferan y forman los centroblastos. Los centroblastos se caracterizan por tener mayor tamaño, citoplasma expandido, cromatina difusa y ausencia de Ig de superficie. Los centroblastos dan lugar a centrocitos, que son células pequeñas que ya expresan Ig sobre la membrana, éstos son estimulados por antígenos, presentados por las células dendríticas foliculares, tras lo cual experimentan una serie de cambios que conducen por un lado a su expansión, con la generación de linfocitos B de memoria, y por otro a su maduración hasta células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Un estadio intermedio entre el linfocito B maduro y la célula plasmática es el linfoplasmocito/plasmablasto.

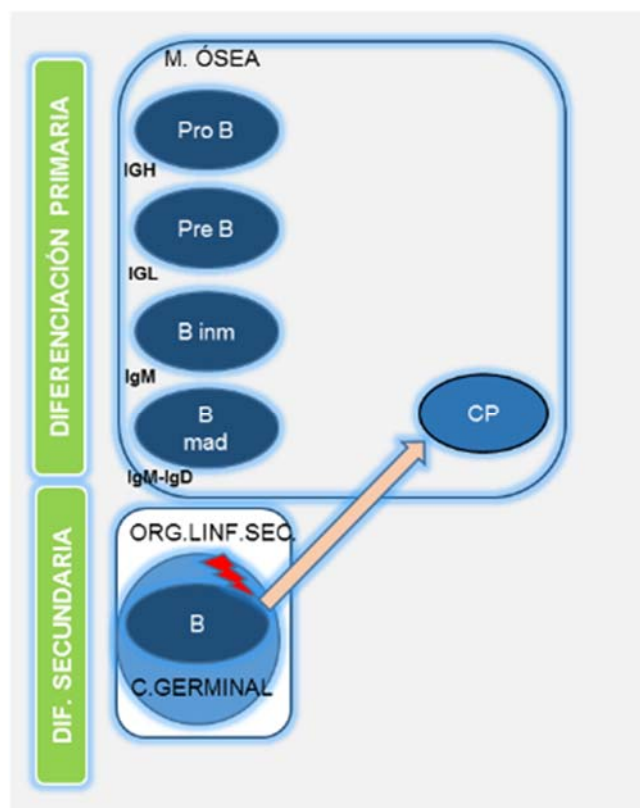
Uno de los cambios que sufren los linfocitos en el centro germinal es la maduración de afinidad mediante la hipermutación somática de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los genes de las

inmunoglobulinas. Durante este proceso el ADN genómico del linfocito está sometido a una serie de mutaciones que pueden determinar cambios en los aminoácidos que codifican, conllevando cambios en la afinidad y especificidad por el antígeno.

Durante el proceso madurativo de la respuesta inmune B, se produce un cambio de isotipo de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, de tal forma que los linfocitos que originariamente expresan en su membrana IgM o IgD, pasan a sintetizar IgG, IgA ó IgE.

Los linfocitos B de memoria se pueden quedar en el folículo formando parte del manto que rodea al centro germinal o pueden abandonarlo y recircular. Los precursores de las células plasmáticas abandonan el folículo linfoide y la mayoría migran a la médula ósea para transformarse en células plasmáticas maduras productoras de anticuerpos. Las células plasmáticas pierden la expresión de inmunoglobulinas de superficie y ya no son capaces de reconocer antígenos sino sólo de producir anticuerpos (Figura 1).

Figura 1. Origen y desarrollo de la CP. (ProB: célula progenitora B con reordenamiento de la cadena pesada; PreB: célula preB con reordenamiento de la cadena ligera; B inm: célula B inmadura que expresa IgM de membrana. B mad: célula B en proceso de maduración, que expresa IgM e IgD y migra a los órganos linfoides secundarios. B: células B maduras en el centro germinal que sufren los procesos de hipermutación somática y cambio de isotipo. Se establece un proceso de selección de clones, que pueden especializarse hacia célula B de memoria o hacia CP).



1.2.2 Ontogenia de la célula plasmática tumoral

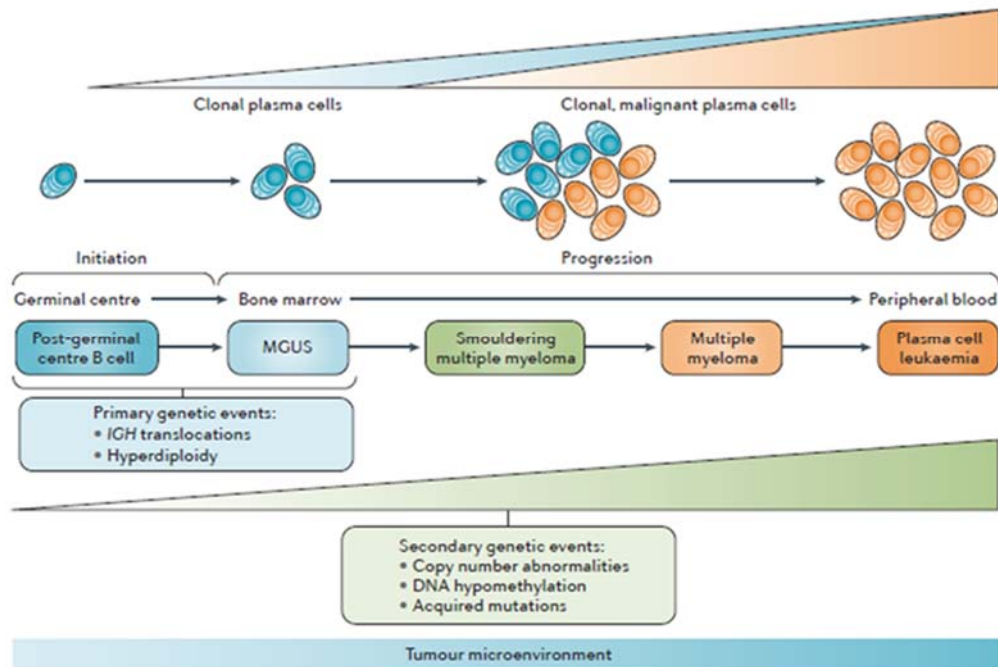
Como se comentó al inicio de la introducción, el MM representa, desde el punto de vista ontogénico, la expresión final de un espectro de gammapatías monoclonales, un grupo de enfermedades caracterizadas por la proliferación clonal de células plasmáticas. En la mayoría de los casos esto se acompaña de la producción de una inmunoglobulina homogénea o componente

monoclonal. En base a los estudios de secuenciación de la región variable de la cadena pesada del gen de las inmunoglobulinas, se acepta que el origen de la célula tumoral del mieloma es un linfocito B (LB) postgerminal de larga supervivencia que ha sufrido el proceso de hipermutación somática y el cambio de isotipo en los órganos linfoides secundarios. Esta célula se traslada posteriormente a la MO donde consigue sobrevivir gracias al contacto con las células del estroma ¹¹.

1.2.3 Alteraciones genéticas y epigénéticas en la célula mielomatosa

Estudios de hibridación in situ fluorescente, análisis en el número de copias mediante arrays de SNP (Single nucleotide polymorphism) y análisis de ultrasecuenciación muestran que el panorama genético complejo del MM ya está presente en las fases tempranas premalignas de la enfermedad, la GMSI y el MM quiescente. De hecho, tanto la GMSI como el MM quiescente reproducen el espectro de alteraciones citogenéticas y de mutaciones del MM sintomático ¹². Sin embargo, recientemente se ha observado que la proporción de células plasmáticas malignas con estas alteraciones es mayor en el MM que en las entidades premalignas ¹³ (Figura 2).

Figura 2. Modelo patogénico del mieloma múltiple en el que se muestra la aparición de los eventos genéticos desde la etapa premaligna de GMSI (siglas en inglés: MGUS) y la expansión clonal ¹¹.



Parece que la transición de GMSI a MM no se asocia con la aparición de nuevas alteraciones genéticas, sino más bien con una expansión del número de CP clonales genéticamente aberrantes que resulta en un cambio de la estructura clonal inicial ¹⁴. Las modernas técnicas de análisis genómico han demostrado que en el MM, como sucede en otras neoplasias, la población tumoral está constituida por una mezcla de subclones genéticamente diferentes. Se ha observado que los cambios genéticos propios de los diferentes subclones se producen dentro del mismo clon original definido por un reordenamiento VDJ de la cadena pesada de las inmunoglobulinas que se mantiene inalterado durante la evolución de la enfermedad ¹⁵. Aunque hay mielomas que no muestran cambios genéticos en la recaída respecto al diagnóstico, el resto siguen dos modelos de evolución genómica según han demostrado los estudios del número de copias cromosómicas y los análisis de mutaciones: uno integrado por los MM que en la recaída presentan cambios adicionales en el subclón mayoritario del diagnóstico, y otro en el que las recaídas derivan de la aparición de subclones procedentes de poblaciones

minoritarias en el momento del diagnóstico y, generalmente, no detectadas por técnicas convencionales. Este último modelo las mutaciones se adquirirían al azar y serían seleccionadas en función de la ventaja proliferativa que confirieran. En este sentido, cabe destacar también la influencia que el microambiente podría tener en el incremento de la capacidad clonogénica de las células de mieloma ¹⁶, así como en la inducción del proceso de desdiferenciación de la célula de mieloma hacia un fenotipo más inmaduro y agresivo ¹⁷.

A continuación, se describen las alteraciones genéticas y epigenéticas más frecuentes en la célula mielomatosa.

1.2.3.1 Alteraciones en el ADN de la célula mielomatosa.

Las alteraciones en el ADN de la célula mielomatosa se pueden categorizar en alteraciones cromosómicas recurrentes y mutaciones.

1.2.3.1.1 Alteraciones cromosómicas

Las anomalías cromosómicas que definen el MM son las traslocaciones del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGH; immunoglobulin heavy locus) y las ganancias y pérdidas cromosómicas. Las traslocaciones del gen IGH (14q32) a diferentes regiones del genoma se observan hasta en el 60% de los MM. Estas translocaciones son quizás eventos iniciadores de la patogenia del mieloma y en gran parte serían responsables de la yuxtaposición de un oncogen y el gen de la IGH, actuando este último como potenciador (enhancer). Estas traslocaciones se originarían a partir de errores durante el proceso fisiológico de recombinación de ADN, principalmente en el momento del cambio de isotipo de la IgH, y se pueden subdividir en 3 grandes grupos:

Las traslocaciones que implican ciclinas: D1 (en 11q13), D3 (en 6p21) y D2 (en 12p13), que están presentes en el 15%, 2% y <1% respectivamente de los casos de mieloma;

Las que involucran a dos genes codificados en 4p16: MMSET (Multiple myeloma SET domain protein containing protein type III) y FGFR3 (Fibroblast growth factor receptor 3), que están traslocados en el 15% de los mielomas.

La sobreexpresión del gen MMSET está presente en todos los MM con t (4; 14) y conduce a cambios globales en la metilación de histonas que promueven la supervivencia de la célula mielomatosa, lo cual confirma su papel central en la patogénesis de este subtipo de mieloma. Por otra parte, la sobreexpresión de FGFR3 provoca la activación de vías de señalización proliferativas como la vía de MAPK (Mitogen-activated protein kinase) Erk 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase-1/2) y anti-apoptóticas como la vía de PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase)/Akt (v-akt murine thymoma viral oncogene);

Las que implican a dos factores de transcripción: c-MAF (Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog) (en 16q23), MAFB (en 21q12), y MAFA (en 8q24.3) traslocados en el 5%, 2% y <1% respectivamente de los casos de mieloma.

Tanto las traslocaciones que involucran a los dos genes codificados en 4p16 como las que implican al factor de transcripción c-MAF codificado en 16q23, se incluyen en la mayoría de las estratificaciones pronósticas como marcadores genéticos de alto riesgo (Tablas 2, 3 y 4).

Tabla 2. Clasificación mSMART del MM (The Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy).

| |
|--|
| Alto riesgo |
| del 17p t(14;16) t(14;20) Firma de alto riesgo según los perfiles de expresión génica |
| Riesgo Intermedio |
| t(4;14) Monosomía 13 en metafase Hipodiploidía Índice proliferativo>3% |
| Riesgo estándar |
| t(11;14) y la t(6;14) Cualquier otra alteración citogenética |

Tabla 3. Clasificación pronóstica por el sistema internacional de estadiaje revisado ISS o R-ISS (Revised International Staging System) que resulta de combinar las cifras de beta-2-microglobulina (β 2M), albúmina, las alteraciones citogenéticas de alto riesgo detectadas por FISH, del 17p (delección del brazo largo del cromosoma 17), t(4;14), t(14;16) (AC) y de la lactato deshidrogenasa (LDH) (n: normal; e: elevada).

| SISTEMA DE CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (ISS) |
|--|
| Estadio I: β 2M en suero <3,5 mg/l y albúmina en suero \geq 3,5 g/dl |
| Estadio II: No entra dentro del estadio I ni el III |
| Estadio III: β 2M en suero \geq 5,5 mg/l |
| SISTEMA DE CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL REVISADO (R-ISS) |
| Estadio I: ISS I, no AC y LDHn |
| Estadio II: No entra dentro del estadio I ni el III |
| Estadio III: ISS III mg/l y AC o LDHe |

Tabla 4. Consenso de IMWG para la estratificación del riesgo.

| Alto riesgo |
|--|
| ISS II/III y t (4;14) ó del 17p |
| Riesgo Intermedio |
| Otros |
| Riesgo estándar |
| ISS I/II, edad < 55años y ausencia de t (4; 14), del 17p, ganancia del brazo corto del cromosoma 1 (1q). |

Aunque en una proporción mucho menor que las traslocaciones del gen IGH, en el MM se detectan reordenamientos del oncogén MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog) (15% de los casos) que no suelen implicar a los genes de las inmunoglobulinas y que generalmente son eventos tardíos en la enfermedad. Las técnicas modernas de ultrasecuenciación detectan, hasta en la mitad de los MM, reordenamientos de MYC a una amplia variedad de superenhancers que inducen un aumento en la expresión de MYC que podría convertirlo en una diana terapéutica ^{18, 19}.

Habitualmente la célula mielomatosa gana y pierde cromosomas completos o regiones cromosómicas que hacen que casi todos los MM sean aneuploides. Estas anomalías podrían generarse a través de la amplificación del centrosoma o de alteraciones en el checkpoint del huso mitótico (en inglés, spindle assembly checkpoint, SAC) y no está claro si se producen como causa o como consecuencia de la transformación maligna. Los MM no hiperdiploides (<48 o >75 cromosomas) se caracterizan por una prevalencia muy elevada de traslocaciones de IGH y monosomía del cromosoma 13. Por el contrario, el grupo hiperdiploide (48 – 75 cromosomas) está asociado con trisomías recurrentes, que afectan especialmente a los cromosomas impares, y con una frecuencia baja de alteraciones estructurales. Los MM hipodiploides se relacionan con una supervivencia más corta.

El cromosoma que más se ve afectado por ganancias y pérdidas de material genómico es el cromosoma 1, en el que el brazo q se gana hasta en el 60% de los casos y regiones de 1p se pierden en un 30-40%, aproximadamente ¹⁷. Las dos alteraciones se han asociado con menor supervivencia. La pérdida de material cromosómico más importante por su significado pronóstico desfavorable es la delección de 17p13 (TP53; tumor protein p53) que aparece en un 8-10%. En los pacientes con MM en estadios avanzados y en progresión, la frecuencia de pérdidas de TP53 es bastante más elevada. Además, parece que la delección de 17p se asocia con la invasión extramedular del MM ²⁰.

En general existe una fuerte asociación entre las anomalías genéticas anteriormente descritas. La coexistencia de más de una alteración de alto riesgo supone un acortamiento significativo de la supervivencia respecto a la presencia de una alteración de alto riesgo de manera aislada. Así, los pacientes con una traslocación de IGH de mal pronóstico, una delección de 17p y una ganancia de 1q tienen tan solo una supervivencia global de 9 meses ²¹.

1.2.3.1.2 Mutaciones

Las estrategias modernas de secuenciación masiva han detectado alrededor de 35 mutaciones no silentes en el genoma del MM, un número superior al observado en leucemias agudas y muy inferior a los cientos de mutaciones presentes en los tumores sólidos. Se ha demostrado que aproximadamente dos tercios de los pacientes con MM tienen ≥ 1 de los once genes recurrentemente mutados siguientes: ACTG1 (Actin Gamma 1), RB1 (Retinoblastoma 1), CYLD (Cylindromatosis (turban tumor syndrome)), PRDM1 (PR/SET domain 1), TRAF3 (TNF receptor-associated factor 3/6), BRAF(v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1), FAM46C (family with sequence similarity 46 member C), DIS3 (DIS3 homolog, exosome endoribonuclease and 3'-5' exoribonuclease), TP53, NRAS (Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog) y KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), con frecuente heterogeneidad intraclonal que juega un papel fundamental en la evolución de la enfermedad y la resistencia a tratamientos. Estas mutaciones pueden ser inactivadoras (TRAF3, CYLD, TP53, RB1) o activadoras (KRAS y NRAS). Las mutaciones más frecuentes se producen en K-RAS (23% de los pacientes) y se asocian con un mal pronóstico ²². Estas mutaciones provocan la activación de vías de señalización MAPK (Mitogen-activated protein kinase) Erk 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase-1/2) y anti-apoptóticas como la vía de PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase)/Akt (v-akt murine thymoma viral oncogene). Otras mutaciones frecuentes en pacientes se dan en NRAS (20%), FAM46C (11%), DIS3 (11%) y TP53 (8%).

1.2.3.1.3 Alteraciones en la metilación del ADN

La metilación del ADN es un proceso epigenético que participa en la regulación y modificación de la expresión génica. Se ha visto que la mediana de metilación global del ADN de CP de pacientes con MM es muy variable. Además, se ha visto que el grado de hipometilación del ADN incrementa a lo largo de la progresión de la enfermedad, sugiriendo que podría ser un factor pronóstico de la misma ^{23, 24}.

1.2.3.1.4 Alteraciones en el transcriptoma

La heterogeneidad genética de las células de mieloma se encuentra reflejada también en los estudios de perfiles de expresión génica. En estos estudios, se han identificado al menos diez subtipos moleculares, que incluyen PR (cell cycle progresión and proliferation), HY (hyperdiploid), LB (low incidence of bone lesions), MS (MMSET-translocation), MF (MAF-translocations), CD-1 (CCND1 or CCND3-translocations), CD-2 (CCND2-translocations with CD20 expression) y otros tres caracterizados por la sobreexpresión de genes implicados en la vía de NFκB, CTA (Cancer testis antigens; genes relacionados con antígenos testiculares tumorales sin sobreexpresión de genes proliferativos) y PTA (Protein tyrosine phosphatase PTP4A3; genes relacionados con las tirosina fosfatasas PTP4A3, PTPRZ1 así como SOCS3). Estos grupos permiten la estratificación de riesgo para el diagnóstico de nuevos pacientes, encontrándose los subtipos PR, MS y MF asociados a alto riesgo ²⁵.

Se ha visto que, la mayoría de los cambios en la expresión génica detectados en las CP tumorales no están aparentemente precedidos de alteraciones en el ADN en forma de mutaciones, anomalías cromosómicas o incluso modificaciones en la metilación del ADN. De hecho, las alteraciones en los procesos de regulación postranscripcional se reconocen cada vez más como causantes de los niveles anormales de expresión génica en la ausencia aparente de cambios en el ADN. Así, el mecanismo de regulación postranscripcional más ampliamente investigado en los últimos años han sido los microRNA (miRNA) que pueden controlar la actividad de más del 30% de todos los genes que codifican proteínas. Varios estudios han demostrado que los miRNA están implicados tanto en el desarrollo normal de la célula plasmática como en la patogenia del MM. En este sentido, se han descrito mecanismos de regulación positiva de TP53 a través de los miR-192, 194 y 215, y del miR-214, que originan una inhibición de la proliferación de la célula mielomatosa, de manera que una disminución en la expresión de estos miRNA puede contribuir a la génesis del MM ^{26, 27}. Además, se ha observado que la desregulación de la expresión de los miRNA está asociada con alteraciones cromosómicas específicas ²⁸.

Aunque los estudios sobre la expresión de los miRNA en tumores se han centrado principalmente en el impacto que los miRNA tienen sobre las propiedades intrínsecas de las células tumorales, cada vez es más evidente que los miRNA también están modelando las interacciones entre las células tumorales y el estroma para el mantenimiento de la carga tumoral, metástasis y desarrollo de fibroblastos asociados al tumor ^{29, 30}.

1.2.4 Influencia del microambiente de la médula ósea en el MM.

La biología y evolución clínica del MM va a depender en parte de las alteraciones genómicas y epigenéticas presentes en las células de mieloma ³¹. Sin embargo, cada vez existe mayor evidencia del papel fundamental que juega el microambiente de la médula ósea en la patogénesis y progresión de la enfermedad ³²⁻³⁴. Las células de mieloma establecen complejas interacciones con otros componentes celulares de la médula ósea (células mesenquimales estromales (CME), osteoclastos (OC), osteoblastos (OB), células endoteliales, adipocitos, células del sistema inmune –células dendríticas, macrófagos, células T, células natural killer NK...), con componentes de la matriz extracelular (ej. laminina, colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos), y también con factores solubles secretados (citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento). Estas interacciones tienen consecuencias bidireccionales: por un lado, las interacciones de las células de mieloma principalmente con las CME y OC activan múltiples vías de señalización intracelular en las propias células de mieloma (PI3K/Akt, JAK/STAT3, Ras/Raf/MEK/ ERK, NFκB), que promueven su proliferación, supervivencia, migración y resistencia a agentes terapéuticos, revisado en ³³. Por otro lado, las células de mieloma desregulan la homeostasis de la médula ósea, disminuyendo la diferenciación y actividad formadora de hueso de los OB y aumentando la diferenciación y actividad resorptiva de los OC, dando como resultado las lesiones osteolíticas propias de la enfermedad ³⁴.

Como consecuencia de las interacciones entre las células del microambiente y las células de mieloma, se secretan moléculas que actúan sobre éstas últimas, activando vías de proliferación, supervivencia, migración

y resistencia a agentes terapéuticos (Figura 3). Las principales citoquinas y factores solubles implicados en la patogenia del MM son ^{33, 35, 36} :

- La IL6 (Interleukin 6), secretada por las células de estroma y OC (aunque también por las propias células de mieloma), es el principal factor de crecimiento y de supervivencia para las células de mieloma. Así, induce su proliferación activando la cascada de las MAPK, protege de la apoptosis inducida por corticoides a través de la vía PI3K/Akt, y promueve su supervivencia por activación de la ruta JAK (Janus kinase)/STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) y la sobreexpresión de moléculas anti-apoptóticas.

- VEGF (Vascular endothelial growth factor), producido tanto por las células de mieloma como por las de estroma, es responsable en parte de la elevada angiogénesis del MM.

Además, promueve la proliferación de las células de mieloma por la vía VEGFR1/Erk, y la migración por la vía PI3K/PKC, así como la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como Mcl-1 (Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)).

- IGF1 (Insulin-like growth factor 1) es secretado por las células de estroma y aumenta el crecimiento, supervivencia y resistencia a fármacos en las células mielomatosas, actuando a través de las vías Ras/MAPK, PI3K/Akt y NF- κ B (Nuclear factor- κ B), y por sobreexpresión de moléculas anti-apoptóticas.

- TNF α (Tumor necrosis factor α) es producido tanto por las células estromales como por las mielomatosas y activa en ambos tipos celulares al factor de transcripción NF κ B, que aumenta la expresión de moléculas de adhesión, como VLA4/5 (Very Late Antigen 4/5) y LFA1 (Lymphocyte Function-Associated Antigen-1) en las células de mieloma y sus ligandos VCAM1 (Vascular cell adhesion molecule 1) e ICAM1 (Intercellular adhesion molecule 1) en las células de estroma. Esto se traduce en un aumento en la adhesión entre ambos tipos celulares, lo que induce a su vez

una mayor secreción de IL6 por parte de las células de estroma, así como la supervivencia y resistencia a fármacos en las células de mieloma.

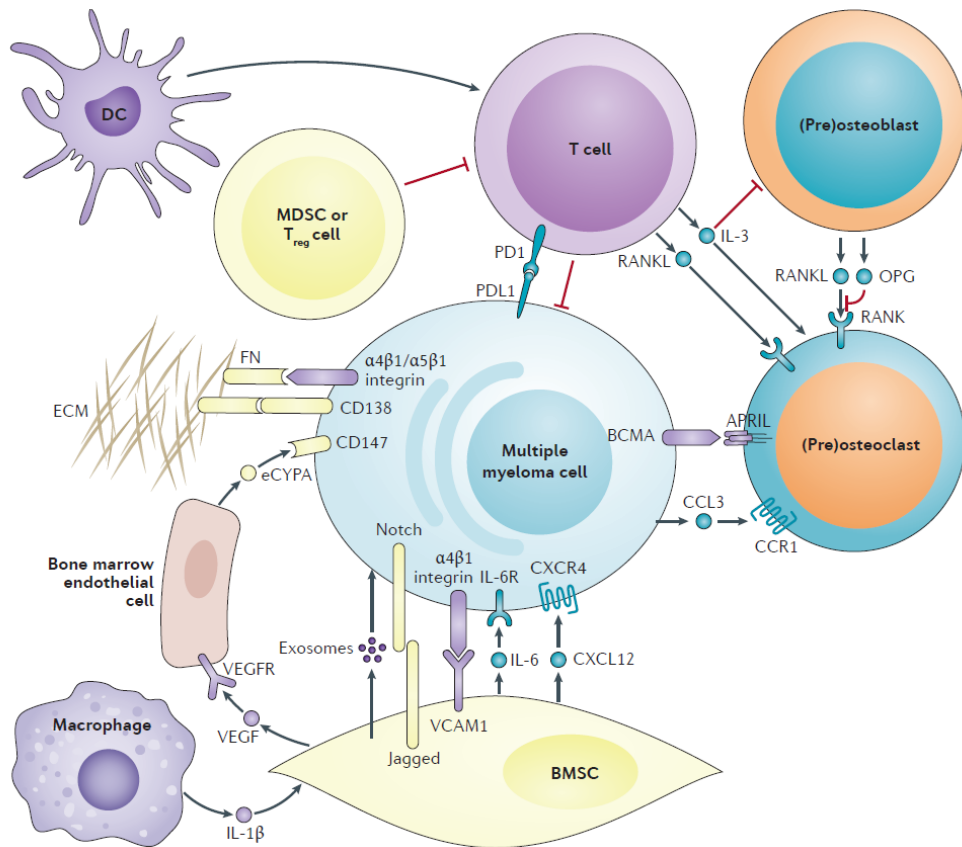
- Por su parte, SDF1 α (Stromal cell-derived factor 1 α), secretado por las células de estroma, promueve la proliferación de las células de mieloma a través de su unión al receptor CXCR4 (Chemokine (C-X-C motif) receptor 4). Esto conduce a la activación de la vía PKC (Protein kinase C), que aumenta la síntesis de metaloproteasas por parte de las CP tumorales y la secreción de IL6 y VEGF por las células estromales. Además, actúa como quimioatrayente para las CP hacia la MO.

- Otros factores como BAFF (B cell activating factor) y APRIL (A Proliferation-inducing ligand), producidos principalmente por los OC, aumentan en las células de mieloma la supervivencia y adhesión a las células de estroma.

La matriz extracelular está constituida por proteínas como fibronectina, colágeno de tipo I y IV, laminina y glucosaminoglucanos como el heparán sulfato, condroitín sulfato y el ácido hialurónico. Las CP mielomatosas expresan en su superficie integrinas de la familia β 1 como VLA4 y VLA5, la integrina α V β 3, CD44, RHAMM y CD138/Syndecan-1, que se van a unir a estos componentes de la matriz extracelular, lo que va a influir sobre todo en la supervivencia y desarrollo de resistencia a fármacos ^{32, 37}.

La unión de la célula de mieloma a los distintos componentes de la matriz extracelular y a las células del microambiente induce un fenotipo CAMDR (Cell adhesion-mediated drug resistance) en la célula mielomatosas, a través de distintos mecanismos ³⁸ : 1) parada de ciclo celular en la fase G₁ asociada a un aumento de los niveles de p27 (inhibidor de CDKs), 2) inhibición de apoptosis mediante sobreexpresión de FLIP (FLICE-like inhibitory protein; inhibidor endógeno del receptor Fas), y 3) protección contra el daño al ADN producido por fármacos, reduciendo la actividad topoisomerasa.

Figura 3. Influencia del microambiente de la MO en el MM ⁸.



Por otra parte, se han descrito otras formas de comunicación intercelular. Se ha visto que como consecuencia de las interacciones entre las células del microambiente y las células de mieloma, se liberan exosomas (pequeñas vesículas membranosas de 50-100 nm de diámetro de origen endosomal que pueden contener miRNAs, mRNAs, fragmentos de DNA y proteínas). Se ha visto que los exosomas derivados de las CME de pacientes con MM (CMEp) presentan un menor contenido en el supresor tumoral miR-15a, y a su vez mayores niveles de proteínas oncogénicas y citoquinas que los exosomas derivados de las CME de donantes sanos, lo que promueve el crecimiento tumoral y contribuye a la progresión del mieloma ³⁹. También hay evidencia de que los exosomas producidos por las CMEp contribuyen a la resistencia adquirida a agentes como el bortezomib ⁴⁰. Por otro lado, las propias células de mieloma también producen exosomas ricos en CD147 que aumentan la proliferación tumoral ⁴¹, y en condiciones de hipoxia producen

exosomas que enriquecidos en miR-135b que estimula angiogénesis en las células endoteliales ⁴².

2. MECANISMOS DE PROGRESIÓN TUMORAL.

Las células plasmáticas sanas se dividen y mueren durante un periodo de tiempo programado, existiendo un balance equilibrado y seguro entre éstas y las diferentes poblaciones celulares del organismo. Sin embargo, la célula plasmática mielomatosa, al igual que sucede en otros tipos de cáncer, “pierde” la capacidad para morir y se divide casi sin límite, invadiendo, destruyendo a otros tejidos sanos y produciendo sintomatología a distancia. El conocimiento de los mecanismos que regulan la muerte y el ciclo celular es esencial para tratar adecuadamente el mieloma.

2.1 LA MUERTE CELULAR.

La muerte celular es un proceso que está estrechamente relacionado no solo con el desarrollo fisiológico normal de los tejidos, sino también, con mecanismos de defensa de varios tipos de enfermedades. Según el comité de nomenclatura de muerte celular (NCCD, Nomenclature Committe on Cell Death) se habla de muerte celular cuando una célula ha perdido la integridad de membrana plasmática, cuando el núcleo se ha fragmentado o cuando los cuerpos apoptóticos han sido fagocitados ⁴³.

La muerte celular puede ser clasificada de acuerdo a sus características morfológicas (apoptosis, necrosis, muerte celular autofágica o muerte celular asociada con mitosis), de acuerdo a criterios enzimáticos (con o sin participación de nucleasas o de diferentes tipos de proteasas como caspasas, calpaínas o catepsinas), de acuerdo a aspectos funcionales (muerte celular programada o accidental, fisiológica o patológica) o de acuerdo a características inmunológicas (inmunogénicas o no inmunogénicas). Es por ello, que el NCCD ha propuesto una clasificación y definición actualizada de las diferentes modalidades de muerte celular que se han descrito hasta el momento y que, brevemente, se describen a continuación ⁴⁴.

Apoptosis: muerte celular programada caracterizada por una serie de cambios morfológicos asociados a una disminución de la adhesión y los contactos intercelulares, alteraciones del citoesqueleto, condensación de la cromatina nuclear, desintegración de los nucleolos, disminución del tamaño nuclear, y condensación del citoplasma y orgánulos.

Necrosis: muerte celular caracterizada por un aumento del volumen de los orgánulos y del citoplasma, moderada condensación de la cromatina y rotura de la membrana plasmática, con la consecuente pérdida del contenido intracelular.

Autofagia: es un tipo celular que ocurre en ausencia de condensación de la cromatina, pero que va acompañada de una vacuolización masiva del citoplasma.

Existen otras modalidades de muerte como: la cornificación, partanatos, la piroptosis, anoikis, entre otras. Sin embargo, tras el tratamiento farmacológico, el mecanismo de inducción de muerte celular por excelencia es la apoptosis. Por lo que en este subapartado, se describe con más detalle esta modalidad de muerte celular.

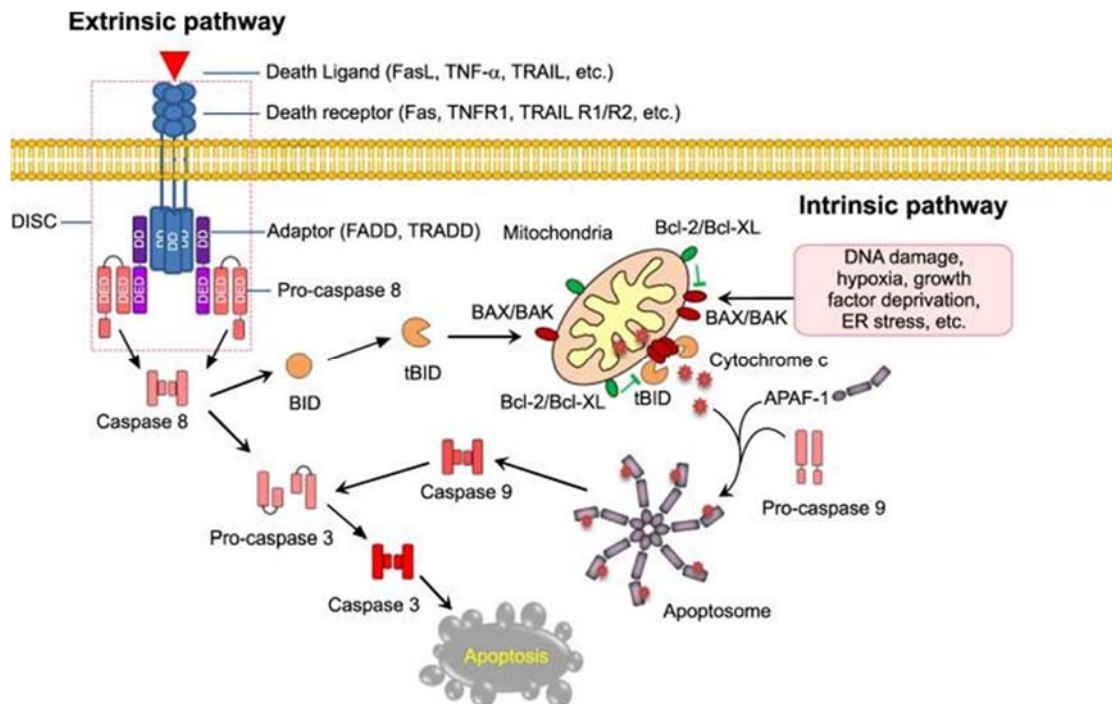
La **apoptosis**, descrita por primera vez por Kerr en 1972, es una forma de muerte celular programada^{45, 46}, como consecuencia del envejecimiento tisular y celular, o en respuesta a diferentes agentes externos como las radiaciones ionizantes, los agentes quimioterápicos ^{45, 47-51} y a la inmunoterapia. 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 por apoptosis puede ser causa y estar asociada al desarrollo de diferentes neoplasias, enfermedades autoinmunes, infecciones virales y enfermedades neurodegenerativas, entre otras ^{47, 50, 51}.

La apoptosis es un proceso activo en el que inicialmente las células reaccionan ante un estímulo activando ellas mismas el proceso de muerte programada ^{46, 52}. Esto desencadena 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. Finalmente, se forman fragmentos nucleares recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos) que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria ^{50, 53-57}.

La apoptosis se lleva a cabo principalmente por dos vías alternativas (Figura 6) ^{45, 46, 48, 52, 58}. Estas dos vías de inducción de apoptosis son: 1) Apoptosis mediada por receptores de muerte expresados en la superficie celular o vía extrínseca; y 2) Apoptosis mediada por la mitocondria o vía intrínseca. 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 son las responsables de la proteólisis directa de múltiples sustratos, conduciendo a la ejecución de la apoptosis. Uno de los primeros sustratos identificados fue PARP (Poly (ADP-Ribose) Polymerase) ⁵⁹. Además, la vía intrínseca induce también muerte celular a través de una vía independiente de caspasas ⁴⁶.

Figura 6. Apoptosis por vía intrínseca y extrínseca (Figura obtenida de ⁶⁰).



A continuación, se describirán con más detalle los mecanismos de ambas vías apoptóticas.

2.1.1. Vía extrínseca: Receptores de muerte.

La vía extrínseca de la apoptosis es activada por los ligandos de la familia del TNF- α que al unirse a sus receptores desencadenan la activación de caspasas y la consiguiente muerte celular ^{46, 50, 59, 61, 62}. Los receptores de muerte 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 posteriormente los dominios DD reclutan moléculas adaptadoras que activarán a la Caspasa-8 y ésta, al ser activada, activará a su vez la Caspasa-3 ^{54, 59, 63}. 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).

2.1.1.1 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 ⁶³. 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 interviene una molécula adaptadora llamada FADD (Fas Associated Death Domain) y la procaspasa-8. FADD se une a Fas mediante sus respectivos dominios DD y a la procaspasa-8 mediante un dominio DED (Death Effector Domain). La oligomerización de la procaspasa-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 (BH3 Interacting Domain Death Agonist), una proteína proapoptótica de la familia de Bcl-2. La traslocación de la forma trunca de Bid a la mitocondria activará la vía intrínseca o mitocondrial ⁶³. Se ha descrito que la vía de Fas participa en la muerte inducida por algunas drogas citotóxicas como son la doxorubicina y el metotrexato ⁶⁴.

2.1.1.2 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 ⁶³. En la activación, TNF 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 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 ⁶³.

2.1.1.3 Receptores de TRAIL.

TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) es el ligando de muerte celular descubierto más recientemente. Las células normales expresan TRAIL, pero son resistentes a la muerte celular inducida por TRAIL, en cambio las células tumorales son sensibles a esta proteína ⁶³. Se han descrito cuatro receptores, de los cuales dos (TRAIL-R1 o DR4 y TRAIL-R2 o DR5) inducen apoptosis y serán los que determinaran si una célula será resistente o sensible a TRAIL ⁶³. Estudios iniciales sugieren que la terapia con TRAIL puede ser una de las estrategias en el futuro, tanto de forma individual como combinada con drogas; en este sentido, en líneas celulares de mieloma se ha demostrado un sinergismo entre el efecto citotóxico inducido por TRAIL y etopósido ⁶⁵.

2.1.2 Vía intrínseca: La mitocondria.

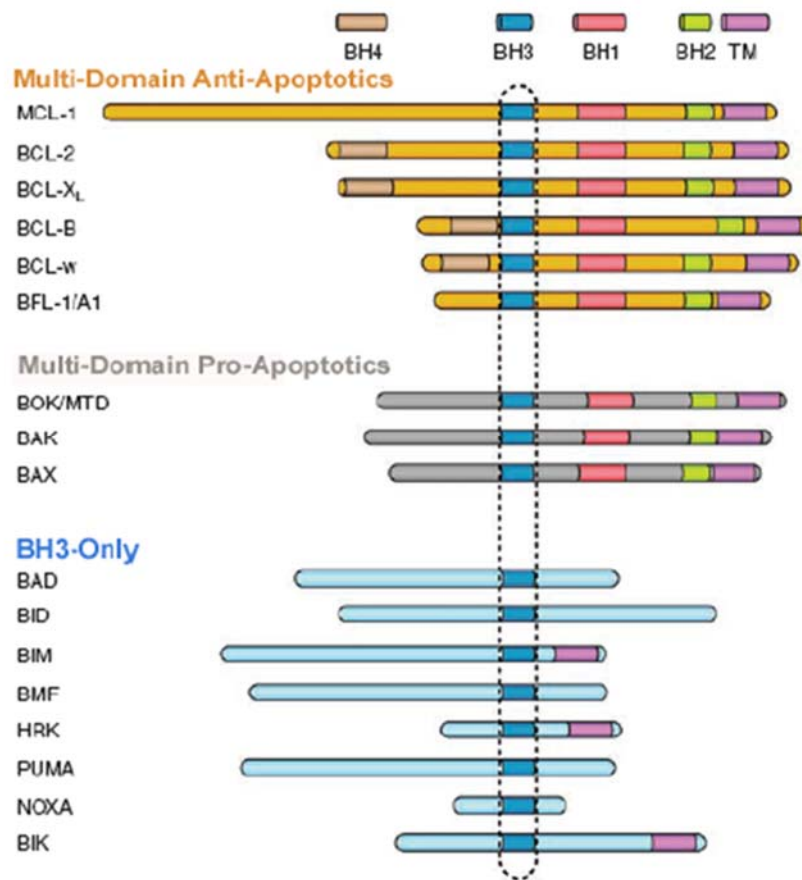
La vía de muerte mitocondrial se observa en respuesta a agentes oxidantes, drogas y factores de crecimiento. Inicialmente, la mitocondria se consideró un elemento pasivo en la muerte celular por apoptosis, que sólo reflejaba daños en las funciones críticas debido a la muerte celular. Pero, el hecho de que Bcl-2 (B cell lymphoma-2) se hallara en la membrana mitocondrial externa sugirió que la mitocondria podía tener una función especial en la apoptosis ⁶⁶.

2.1.2.1 Las proteínas de la familia Bcl-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 se encargan de regular la apoptosis por vía intrínseca mediante un mecanismo complejo de interacciones entre ellas; controlando la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de factores apoptogénicos al citosol. Estas proteínas se caracterizan por compartir en su estructura al menos uno de los dominios conservados BH, conocidos como Bcl-2 homology domains (BH1-BH4) y se clasifican en base a su función y estructura en 1) Proteínas antiapoptóticas, que contienen los 4 dominios (excepto la proteína antiapoptótica Mcl-1, que carece del dominio

BH4), 2) Proteínas proapoptóticas que contienen los dominios BH1-3, y 3) Proteínas proapoptóticas que contienen únicamente el dominio BH3 (BH3 only) 47, 49, 67-69 , dominio que es esencial para la actividad apoptótica de estas proteínas (Figura 7).

Figura 7. Esquema de la estructura de las proteínas de la familia Bcl-2 (Figura obtenida de ⁷⁰). BH1-BH4: dominios de homología con Bcl-2; TM: fragmento transmembrana.



Dentro del primer grupo de proteínas que inhiben la apoptosis y/o promueven la supervivencia celular se incluyen fundamentalmente Bcl-2, Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) y Mcl-1 (Myeloid cell leukemia factor-1), y se localizan en la membrana mitocondrial externa. También se pueden localizar en la membrana del retículo endoplasmático y en la membrana nuclear, así como en el citosol de células sanas, redistribuyéndose a las membranas en respuesta a un estímulo apoptótico. Dentro de los miembros de la familia de

Bcl-2 que inducen apoptosis, con homología restringida al dominio BH3, se agrupan las proteínas Bim (Bcl-2 interacting protein), Bad (Bcl-2 antagonist of cell death) y Bid (Bcl-2 interacting domain); se localizan principalmente en el citosol y en respuesta a estímulos apoptóticos se traslocan a la mitocondria. Los cambios de localización pueden ser debidos a cambios en su estado de fosforilación descrito en la proteína Bad o por proteólisis como ocurre en la proteína Bid. Dentro de los miembros de la familia de Bcl-2 que inducen apoptosis con homología BH1-3 se encuentran las proteínas proapoptóticas efectoras Bak (Bcl-2 antagonist killer) y Bax (Bcl-2 associated-X protein). Estas proteínas en condiciones normales se encuentran en forma de monómeros inactivos. Bak se localiza anclada en la membrana mitocondrial externa mientras que Bax se encuentra en el citosol y en menor proporción asociado a la membrana externa de las mitocondrias. La inducción de la vía intrínseca por diferentes estímulos apoptóticos lleva a la activación por cambios de conformación u oligomerización de las proteínas Bak y Bax y a la traslocación de Bax del citosol a la mitocondria para formar poros en la membrana mitocondrial permitiendo la salida de factores apoptogénicos al citosol.

2.1.3. Factores apoptogénicos liberados en la mitocondria.

Entre los factores apoptogénicos que se liberan en respuesta a estímulos apoptóticos destacan:

2.1.3.1. 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 el complejo llamado apoptosoma, induciendo la activación de la Caspasa-9 y, consiguientemente, la vía intrínseca de la apoptosis ^{50, 54, 61, 71}.

2.1.3.2 Smac/Diablo.

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 (inhibitor apoptosis proteins) ^{72, 73}. Cuando se produce una pérdida del potencial mitocondrial, de forma simultanea a la liberación de Citocromo-C, se libera Smac/Diablo que se une a las IAPs (XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein), c-IAP1, c-IAP2, y survivina) en el citoplasma ^{74,75} y las bloquea, inhibiendo su función y potenciando la activación de caspasas y la vía de apoptosis mitocondrial. Por su parte, la liberación de Smac/Diablo es inhibida por Bcl-2 y Bcl-xL ⁷⁵.

Otras dos proteínas que pueden ser liberadas desde la mitocondria al citosol y que inducen la apoptosis independientemente de las caspasas son AIF (Apoptosis Inducing Factor) y Endonucleasa-G (Endo-G).

2.1.3.3 AIF

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 se proteoliza en el espacio intermembrana. En respuesta a señales de muerte, AIF sale de la mitocondria y se traslada a través del citosol hasta el núcleo, dónde se une al ADN provocando condensación de la cromatina y fragmentación del ADN en fragmentos de aproximadamente 50 Kb ⁷⁴.

2.1.3.4 Endonucleasa-G (Endo-G)

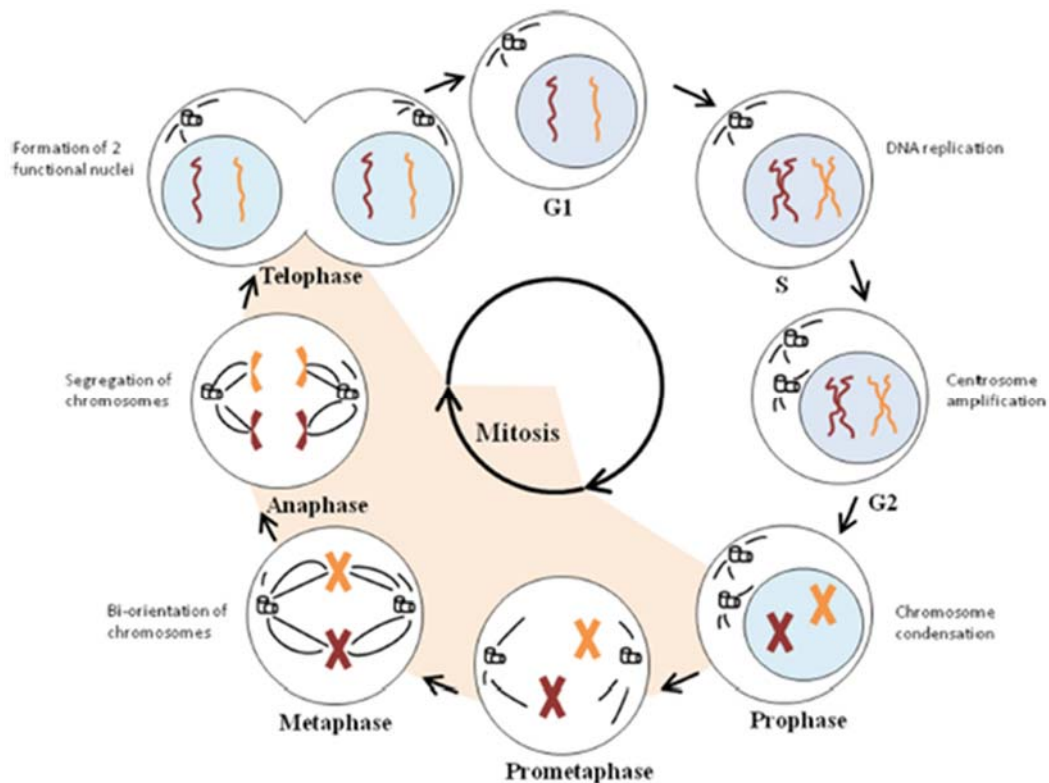
Endo-G es una proteína esencial para la replicación del ADN mitocondrial. Una vez liberada al citosol se traslada al núcleo dónde fragmenta el ADN, de forma independiente de caspasas. Endo-G coopera con la exonucleasa y ADNasa facilitando el procesamiento del ADN ⁷⁶.

2.2 EL CICLO CELULAR.

La capacidad de proliferación de una célula viene determinada por la maquinaria molecular implicada en su ciclo celular, que ejecuta de forma ordenada una serie de procesos que culminarán con su división en las células hijas.

El ciclo celular se divide en varias fases: G_1 (Gap 1), S (síntesis), G_2 (Gap 2), M (mitosis). En G_1 se sintetizan las proteínas necesarias para la progresión a fase S, en la que se produce la replicación del material genético. En la fase G_2 , que precede a la fase de mitosis o fase M, se duplican los centrosomas. En la fase M tiene lugar la división nuclear y citoplasmática. La fase M o de mitosis a su vez está compuesta de varias fases. En profase tiene lugar la condensación de los cromosomas, mientras que la formación del huso y la ruptura de la envoltura nuclear ocurre en prometafase. En metafase, los cromosomas se orientan alineados en el huso mitótico para después segregarse en anafase. Durante la última etapa de la mitosis, en telofase, se forman dos núcleos funcionales y dos células hijas (figura 14).

Figura 14. Fases del ciclo celular. Figura adaptada de ⁷⁷.



2.2.1 Regulación del ciclo celular.

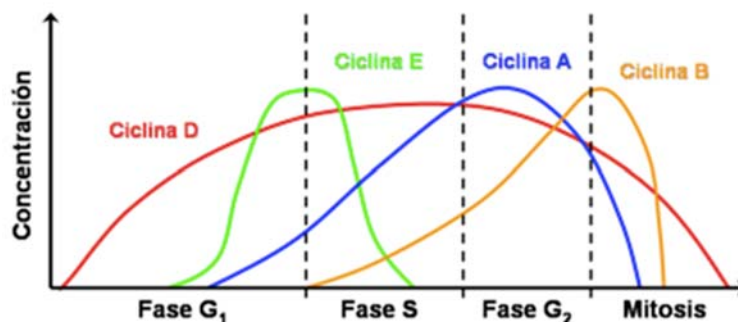
A lo largo del ciclo existen puntos de control o checkpoints que supervisan momentos críticos del ciclo celular, como son el tamaño de las células, la replicación del ADN, la segregación de los cromosomas y la presencia de lesiones en el ADN ⁷⁸⁻⁸¹. Así en G₁, se ha definido en mamíferos el punto R o 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. 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 ⁷⁸. Una vez superado este punto la célula está preparada para entrar en mitosis. En esta fase, el punto de control M, también conocido como punto de control del ensamblaje del huso (en inglés “spindle assembly checkpoint”, SAC), asegura la correcta segregación cromosómica en mitosis, evitando así la aparición de aneuploidías. Controla los acontecimientos que tienen lugar desde la ruptura de la envoltura nuclear hasta la metafase tardía, asegurando

que todos los cromosomas estén correctamente anclados al huso mitótico y alineados en la placa metafásica. La activación de este checkpoint provoca la parada del ciclo celular como consecuencia de la inhibición del Complejo Promotor de la Anafase/Ciclosoma (APC/C; Anaphase Promoting Complex/Cyclosome).

La regulación del ciclo celular se lleva a cabo por un complejo sistema de moduladores entre los cuales se encuentran las ciclinas, las CDKs (cyclin dependent kinases) y los CDKIs (CDK inhibitors).

Las **ciclinas** y las **CDKs** forman complejos regulados por múltiples vías y son los encargados de activar el ciclo celular. Las ciclinas se agrupan según el momento del ciclo en el que actúan (Figura 15). Son proteínas de vida muy corta que tras dissociarse 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; así, por ejemplo, las ciclinas B (B1 y B2), que son necesarias en mitosis, se comienzan a sintetizar al comienzo de la fase S, alcanzando un máximo al inicio de la mitosis para luego disminuir en las últimas etapas de la misma.

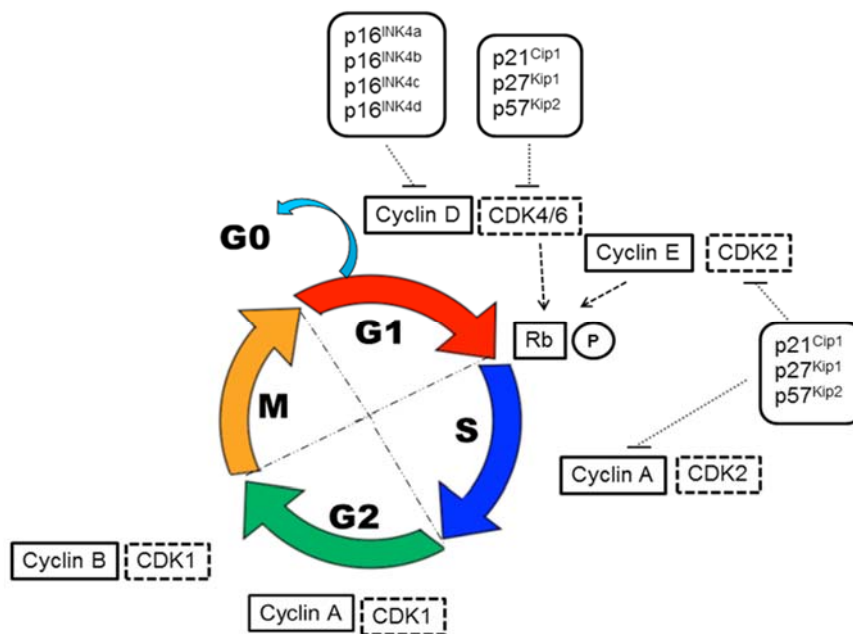
Figura 15. Expresión diferencial de ciclinas a lo largo del ciclo celular (Imagen modificada del libro "Control of the cell cycle: Figure 2," del OpenStax College, Biology (CC BY 3.0)).



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 ^{82, 83}. Los complejos

CDK-ciclina (Figura 16) son necesarios para la transición entre las distintas fases del ciclo celular, fosforilando distintos sustratos en las diferentes fases del ciclo. Por ejemplo, el complejo CDK4/CDK6/ ciclina D fosforila a la proteína retinoblastoma (codificada por el gen RB1) y permite la progresión del ciclo celular de fase G₁ a S; el complejo CDK1/ ciclina B fosforila a más de 70 proteínas implicadas en diversos procesos dentro del paso de G₂ a M, entre ellos, la condensación de los cromosomas, la fragmentación de la red de Golgi y la ruptura de la lámina nuclear ⁸⁴; su inactivación es necesaria en las últimas fases de la mitosis (una vez que los cromosomas están perfectamente alineados en la placa metafásica y anclados mediante los microtúbulos a ambos polos del huso) para completar la división celular; para ello se produce la proteólisis de la ciclina B por el complejo APC/C.

Figura 16. Complejos de ciclinas y CDKs a lo largo del ciclo celular (figura del libro D. Lombardi y L. Lasagni del libro "Cell Biology - New Insights", 2016).



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

- La familia CIP/KIP cuyos tres miembros: p21CIP1/WAF1, p27KIP1 y p57KIP2, tienen un amplio espectro de inhibición ya que son

- capaces de inhibir los complejos CDK1-ciclina A, CDK1-ciclina B, CDK2-ciclina A, CDK2-ciclina E, CDK4-ciclina D y CDK6-ciclina D.
- La familia de INK4 cuyos cuatro miembros: p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c y p19INK4d, se unen e inhiben exclusivamente a las CDKs dependientes de ciclina D: CDK4 y CDK6 ⁸⁵.
 - El gen supresor p53 también conocido como TP53. Es el gen supresor de tumores más estudiado que codifica una 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 ⁸⁶. p53 está involucrada en los puntos de control o checkpoints de respuesta al daño en el ADN. Entre los diferentes genes modulados por la acción de p53 implicados en la apoptosis están Bcl-2 y Bax ⁸⁷⁻⁹¹.

3. TRATAMIENTO DEL MIELOMA MÚLTIPLE.

El MM ha sido quizás la neoplasia hematológica en la que se han desarrollado y aprobado en los últimos años un mayor número de nuevos agentes que han revolucionado favorablemente el tratamiento y el pronóstico de esta enfermedad, pasando de tratamientos basados en la quimioterapia convencional a la terapia dirigida que ataca específicamente al tumor basándose en sus mecanismos oncogénicos.

Hasta hace pocos años para el tratamiento del MM sólo se disponía de esquemas con quimioterapia combinada a dosis convencionales junto con glucocorticoides. Menos del 5% de los pacientes alcanzaban remisiones completas (RC) y la mediana de supervivencia global (SG) era muy baja, de unos 2-3 años ^{10, 92-94}. Esto se debía a que muchos de los pacientes no respondían a las terapias disponibles y sobre todo a que las respuestas eran poco duraderas, con recidivas inevitables y agresivas en prácticamente todos los pacientes, considerándose una neoplasia incurable en todos los casos. En

la década de los 90 surgió el concepto de dosis altas de quimioterapia con rescate celular (trasplante autólogo) lo cual logró una tasa elevada de RC (30-40%) con un aumento significativo de la SG ⁹⁵⁻⁹⁸. Pero la principal revolución en el tratamiento del MM fue el hallazgo, en 1.998 por parte del Grupo de Arkansas, del efecto antitumoral de la talidomida sobre esta enfermedad, con tasas de respuestas duraderas en pacientes en recaída o refractarios a la quimioterapia ⁹⁹. Algo particularmente relevante fue descubrir que el mecanismo de la talidomida sobre el MM no era sólo sobre la propia CP tumoral sino también sobre el microambiente de la médula ósea en la que proliferan estas células, incluyendo una inhibición de la angiogénesis y una regulación favorable del sistema inmune contra el tumor, actuando como inmunomodulador. Un fármaco proscrito y maldito, que se empleó por error como antiemético en las gestantes en los años 60, originando graves casos de teratogenia, encontró una nueva utilidad y supuso un cambio en el tratamiento de esta enfermedad. Estos hallazgos conllevaron un estudio más profundo de la patogenia del MM incluyendo sus bases moleculares, las vías de señalización celular y el papel del sistema inmune, abriéndose una etapa de desarrollo de nuevos fármacos con diferentes mecanismos de acción no citostáticos. La talidomida supuso el primero de un grupo de agentes denominados inmunomoduladores (IMiD), pero de ella se derivaron fórmulas más potentes y mejor toleradas como la lenalidomida y más recientemente la pomalidomida. Posteriormente a la talidomida se desarrolló el bortezomib, primer inhibidor del proteasoma (IP). Tras el bortezomib se ha aprobado recientemente un nuevo IP como es el carfilzomib sin resistencia cruzada y están en desarrollo otros IP que luego se comentarán ¹⁰⁰⁻¹¹⁰.

Finalmente, se han desarrollado muchos otros agentes basados en diferentes mecanismos como son anticuerpos monoclonales (daratumomab, elotuzumab) o los inhibidores de histona deacetilasa (panobinostat) ¹⁰⁰⁻¹¹⁰ (Figura 4).

Figura 4. Perspectiva histórica del tratamiento del MM.

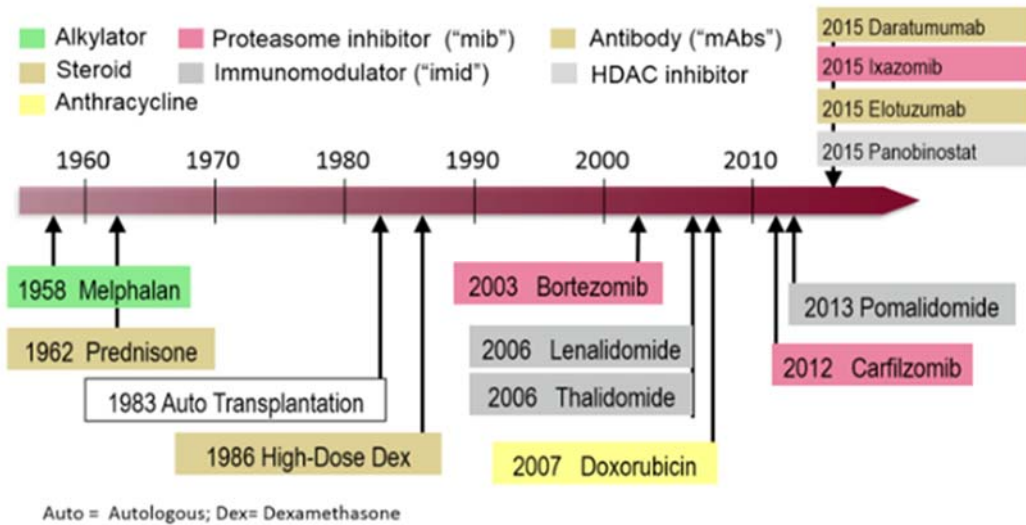


Imagen obtenida de www.myeloma.org

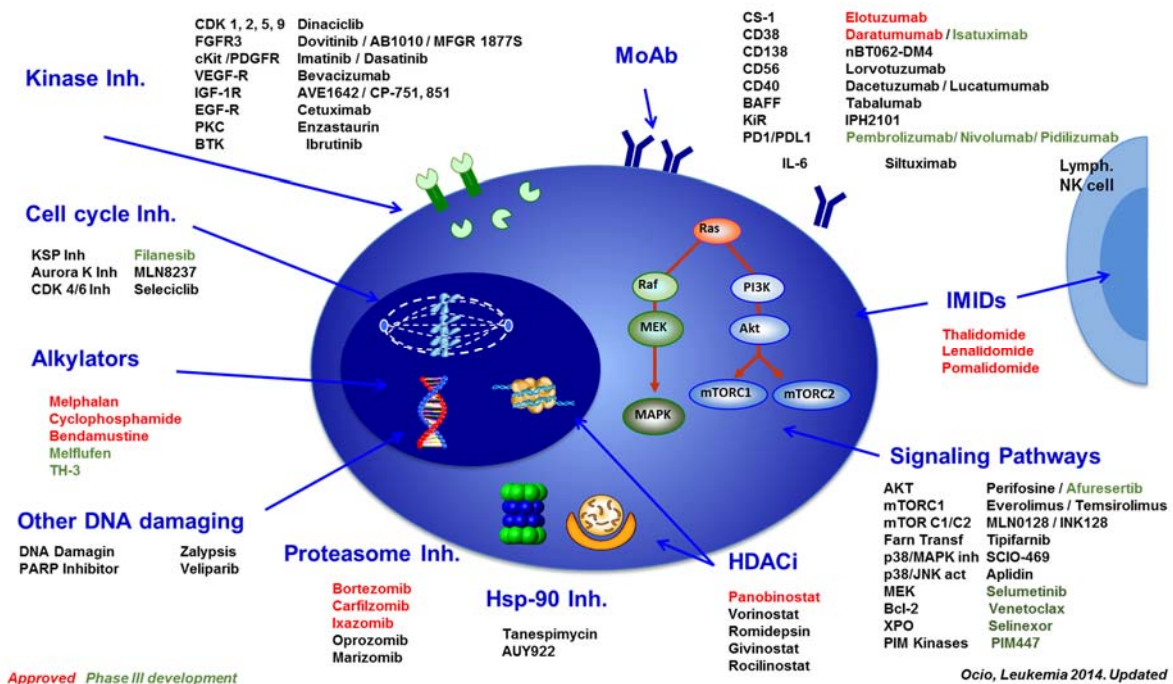
La disponibilidad de los nuevos agentes descritos junto con el trasplante autólogo en los pacientes candidatos al mismo, ha cambiado radicalmente el tratamiento del MM en los últimos años, con una mejora radical del pronóstico y de la supervivencia global (SG). De considerarse una enfermedad incurable, de muy difícil control, con graves complicaciones y con una mediana de SG de 2-3 años se ha pasado a una mediana de SG de 7-8 años en muchos pacientes, con un fracción de casos con largas supervivencias, pudiéndose hablar incluso de control prolongado o curación.

Sin embargo, a pesar de estos avances, la mayoría de pacientes no responden a los tratamientos pautados o recaen tras un periodo de respuesta, debido a la presencia o desarrollo de resistencias.

Aunque no se ha asociado ninguna alteración directamente responsable de la aparición del clon tumoral, parece que el desarrollo tumoral es consecuencia de diferentes alteraciones patogénicas que cooperan simultáneamente. Por este motivo el tratamiento del MM ha consistido tradicionalmente en la utilización de combinaciones farmacológicas. La

inhibición de estas alteraciones por separado, al menos hasta el momento, no se ha demostrado suficiente para erradicar el MM y es necesario actuar sobre varias de ellas mediante combinaciones para evitar que la célula tumoral sobreviva utilizando mecanismos alternativos al que está siendo inhibido y desarrolle resistencia. En este sentido, en la actualidad se están explorando numerosos fármacos con mecanismos de actuación específicos tanto en fases preclínicas como clínicas (Figura 5) ⁹. Entre los que destacan los inhibidores de histonas deacetilasas, los anticuerpos monoclonales; o inhibidores específicos de algunas proteínas o vías implicadas en proliferación o supervivencia tumoral (MEK-ERK, Kinesin Spindle Proteins, Pim-Kinasas, Exportina-XPO1). La disponibilidad de varios de estos fármacos permitirá diseñar nuevas combinaciones para intentar evitar la aparición de estos mecanismos de resistencia.

Figura 5. Dianas terapéuticas principales en las células plasmáticas de MM y los agentes que las tienen como objetivo (Figura actualizada ⁹). Los fármacos aprobados se presentan en rojo mientras que los verdes se encuentran en la fase III del desarrollo clínico.



El conocimiento del mecanismo de inducción de muerte celular de estos agentes dirigidos frente a dianas tumorales específicas es esencial a la hora de diseñar la mejor estrategia anti-mieloma en ensayos clínicos que combinen nuevas moléculas con agentes ya en uso.

3.2 AGENTES APROBADOS PARA EL TRATAMIENTO DEL MM

3.2.1 Los glucocorticoides

La dexametasona es el fármaco más utilizado en el tratamiento del MM ^{111, 112}. La dexametasona induce la activación de laaspasa-9 a través de la liberación de Smac/Diablo, pero no induce la liberación de Citocromo-C ¹¹³ e inhibe a la vía NF- κ B, constitutivamente activada en la mayoría de las muestras de mieloma y asociada con la alteración genética o epigenética de moléculas como TRAF3, CYLD, BIRC2/3, CD40 y NF κ B ¹¹⁴.

Este fármaco forma parte de la mayoría de las combinaciones utilizadas actualmente en las terapias anti-mieloma.

3.2.2 Los agentes alquilantes

Los agentes alquilantes fueron los primeros fármacos quimioterápicos en demostrar actividad en el MM y han sido y continúan siendo unos de los fármacos esenciales en el tratamiento de esta enfermedad. Así, el melfalán es el agente quimioterápico más utilizado en el tratamiento del MM ¹¹⁵. Pertenece al grupo de las nitrosoureas, dentro de los compuestos alquilantes. Los alquilantes forman uniones covalentes con los ácidos nucleicos (con las bases nitrogenadas del ADN), proteínas y otras moléculas pequeñas con grupos ricos en electrones; de este modo, bloquean la replicación del ADN celular y la transcripción del ARN y, por tanto, la mitosis y la síntesis de proteínas. Son activos en todas las fases del ciclo celular. El mecanismo por el cual induce apoptosis en células de MM no se conoce bien, pero se ha demostrado que implica una disminución en la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2: Mcl-1 y Bcl-xL ¹¹⁶.

Nuevos fármacos con este mecanismo de actuación están siendo explorados. La bendamustina es uno de estos fármacos con un mecanismo de actuación peculiar ya que combina un anillo alquilante con un radical análogo de las purinas, alterando la síntesis y reparación del ADN. Está aprobado en Europa en combinación con prednisona para pacientes de nuevo diagnóstico no candidatos a trasplante ni a recibir inhibidores de proteasomas o talidomida debido a neuropatía previa. Asimismo, distintos estudios piloto han mostrado eficacia de este fármaco en combinación con bortezomib, talidomida o lenalidomida, fundamentalmente en pacientes en recaída.

3.2.3 Inhibidores del proteasoma

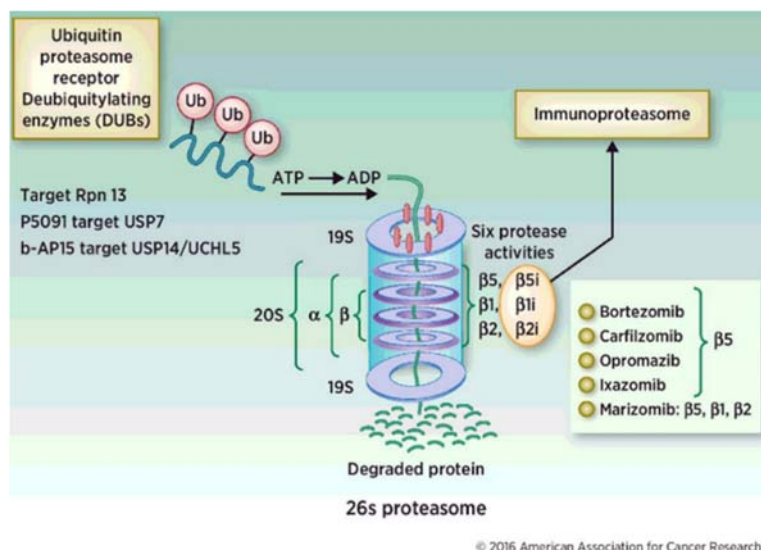
Inicialmente se pensaba que los proteasomas y el sistema ubiquitina-proteasoma sólo actuaban sobre proteínas dañadas, pero hoy sabemos que también degradan de forma fisiológica proteínas del ciclo, proliferación y diferenciación celular. Así el sistema ubiquitina-proteasoma (Figura 8) es uno de los medios 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^{117, 118}.

La inhibición del proteasoma produce la acumulación intracelular de diferentes 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 carfilzomib o ixazomib (MLN9708), 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- κ B, 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.

Figura 8. Figura 8. Vía ubiquitina-proteasoma. Figura obtenida de
119



3.2.4 Agentes inmunomoduladores (IMiD)

Desde el descubrimiento del efecto anti-mieloma de la talidomida, reseñado previamente, se han desarrollado distintos análogos, entre los que se encuentran la lenalidomida y la pomalidomida. Estos fármacos se conocen como agentes inmunomoduladores o IMiDs (immunomodulatory imine drugs). Se han establecido tres mecanismos mediante los cuales estos fármacos llevan a cabo su función anti-mieloma: mecanismo antitumoral directo, efecto antiangiogénico y efecto inmunomodulador (Figura 9).

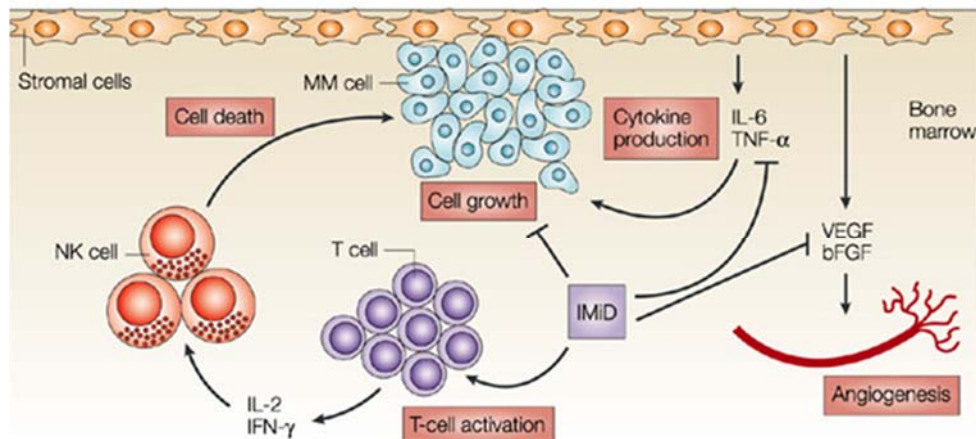
Aunque aún no se ha establecido el mecanismo de acción exacto de este grupo de fármacos, estudios recientes han demostrado que se unen a cereblon, una molécula que forma un complejo E3 ubiquitín ligasa con la proteína DDB1 (Damage-specific DNA binding protein 1) y con Cul4A (Cullin 4). De hecho, la ausencia de cereblon se asocia con resistencia a los IMiD.

Esta unión desencadena diversos mecanismos que conducen a su efecto antitumoral. Por un lado, la regulación negativa de IRF4 provoca una parada del ciclo celular en fase G1, disminuyendo la proliferación celular y provocando la muerte celular asociada con una disminución de los niveles de MYC y la inducción de diferentes inhibidores CDK(p15, p16, p21 y p27) ¹²⁰. Por otro lado, la inducción de p21 conlleva la expresión de WAF1 mediante un mecanismo epigenético mediado por LSD1 ¹²¹. El efecto antiangiogénico se ha asociado con la disminución de VEGF e IL6 que promueven los IMiD ¹²².

En cuanto al efecto inmunomodulador cabe mencionar, de forma muy resumida, que está mediado, entre otros, por el aumento de la citotoxicidad de las células NK, por la inhibición de las células T reguladoras y por el aumento de la activación de los linfocitos T citotóxicos ^{123, 124}.

Si bien talidomida, lenalidomida y pomalidomida comparten una estructura y mecanismo básicos comunes, difieren en sus propiedades citotóxicas, antiangiogénicas e inmunomoduladoras. La pomalidomida manifiesta una mayor inducción de la interrupción de la fase de crecimiento G1 y de la apoptosis de las líneas celulares de MM y en células de MM de sujetos que presentan resistencia a melfalán, doxorubicina y dexametasona, e incrementa la actividad anti-MM de la dexametasona ¹²⁵. Cabe señalar que la combinación de pomalidomida y dexametasona muestra una fuerte sinergia, a través de una inhibición de la proliferación celular e inducción de la apoptosis. Además, estudios preclínicos han demostrado que este agente es capaz de vencer la resistencia a lenalidomida ¹²⁶. Estas observaciones se han confirmado en la clínica donde pomalidomida en combinación con dexametasona ha inducido un 30% de respuestas en pacientes refractarios a lenalidomida y a bortezomib y resistentes a la última línea, con una supervivencia libre de progresión (SLP) de 4 meses y ha prolongado hasta un año la supervivencia global de estos pacientes ^{125, 127-129}, lo que llevó a la aprobación de esta combinación por parte de las agencias reguladoras para su utilización en pacientes con MM en recaída. Actualmente se están testando nuevas combinaciones con nuevos agentes y pomalidomida + dexametasona en este grupo de pacientes.

Figura 9. Mecanismo de acción de los IMiD (Figura obtenida del libro *Angiogenesis: An integrative approach from science to medicine* (pp.387-394)).

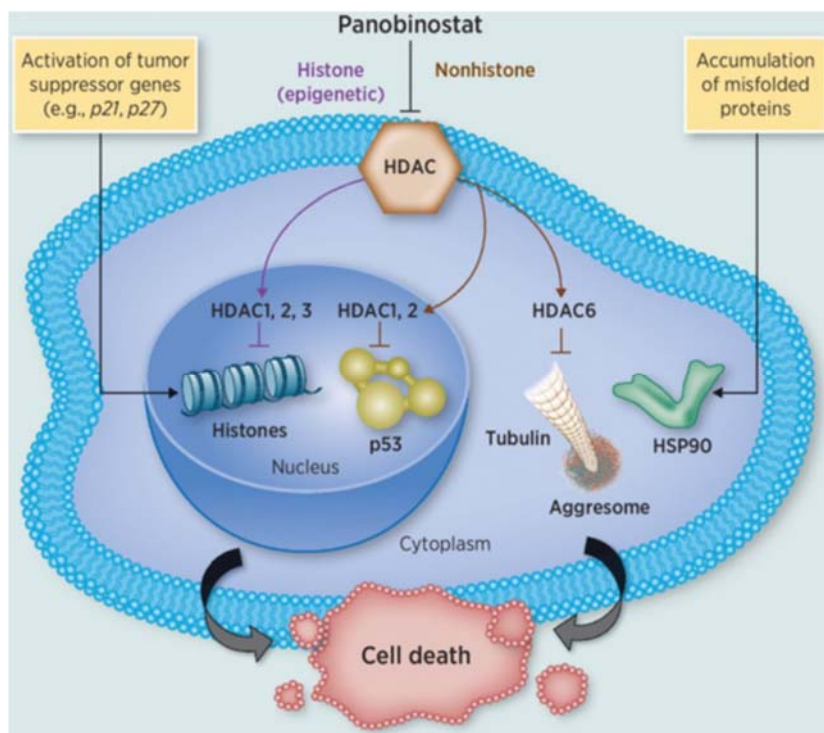


3.2.5 Inhibidores de las deacetilasas de histonas (HDACi)

Las deacetilasas (DAC), también denominadas histona deacetilasas (HDAC), son enzimas especializadas en la eliminación de grupos acetilo de los residuos de lisina de diferentes proteínas, tanto histonas como no histonas. Se ha descrito su papel en la oncogénesis tanto mediante su actividad epigenética al modificar el estado de acetilación de histonas, como mediante la regulación de proteínas no histonas, relevantes en la progresión tumoral, como p53, proteínas de la familia E2F, Bcl-6, Hsp-90^{130, 131}. En mamíferos se han descrito 18 HDAC divididas en cuatro clases: las de clase I, II y IV, que son las clásicas y las que han sido principalmente implicadas en los procesos oncogénicos, y las de clase III, también denominadas sirtuinas, que tiene un mecanismo catalítico distinto^{130, 131}. Las HDAC se encuentran sobreexpresadas en diferentes tumores, incluido el MM, por lo que podrían ser una diana terapéutica interesante para el tratamiento de esta enfermedad.

Panobinostat (también conocido como LBH589) es un inhibidor de histona deacetilasas de clase I y II (pan-inhibidor), recientemente aprobado en combinación con bortezomib y dexametasona para el tratamiento de pacientes con MM refractario, cuya concentración inhibitoria se encuentra en el rango nanomolar y que presenta una potencia diez veces superior a vorinostat ¹³². Se piensa que panobinostat ejerce su actividad antitumoral principalmente a través de la modulación epigenética de la expresión génica y la inhibición del metabolismo proteico ¹³³. La inhibición de las histonas deacetilasas clase I, que tienen como diana histonas y factores de transcripción como p53, podría ayudar a reactivar supresores tumorales que estaban silenciados epigenéticamente (sería el caso de p21) ¹³⁴ y modificar la expresión génica a través de la inhibición de Akt y del factor inducible por hipoxia 1 α ¹³⁵. El efecto antitumoral directo de panobinostat en el mieloma ha sido demostrado en estudios preclínicos observándose que este fármaco es capaz de bloquear el ciclo celular e inducir apoptosis ¹³⁶.

Figura 10. Mecanismo de acción de Panobinostat (Figura obtenida de ¹³²).



Panobinostat ha mostrado que actúa de forma sinérgica con bortezomib. Esta sinergia se puede explicar, en parte, a través del efecto de panobinostat sobre la degradación de proteínas. Las células con MM tienen altos niveles de producción de proteínas y por tanto son susceptibles a los inhibidores de proteosomas, que inhiben el metabolismo y eliminación de las proteínas generadas dentro de la célula y a través de este mecanismo producen una señal proapoptótica. Bortezomib inhibe la degradación del proteosoma e induce la formación del agresoma (vía alternativa para la degradación de proteínas) que es transportado mediante microtúbulos a un autofagosoma donde es degradado por los lisosomas. La inhibición de la HDAC6, por parte de panobinostat, conduce a la hiperacetilación de los microtúbulos y a una degradación ineficaz del agresoma. Así, la inhibición simultánea de las vías del proteosoma y agresoma, da como resultado la citotoxicidad sinérgica.

3.2.6 Anticuerpos monoclonales (AcMo)

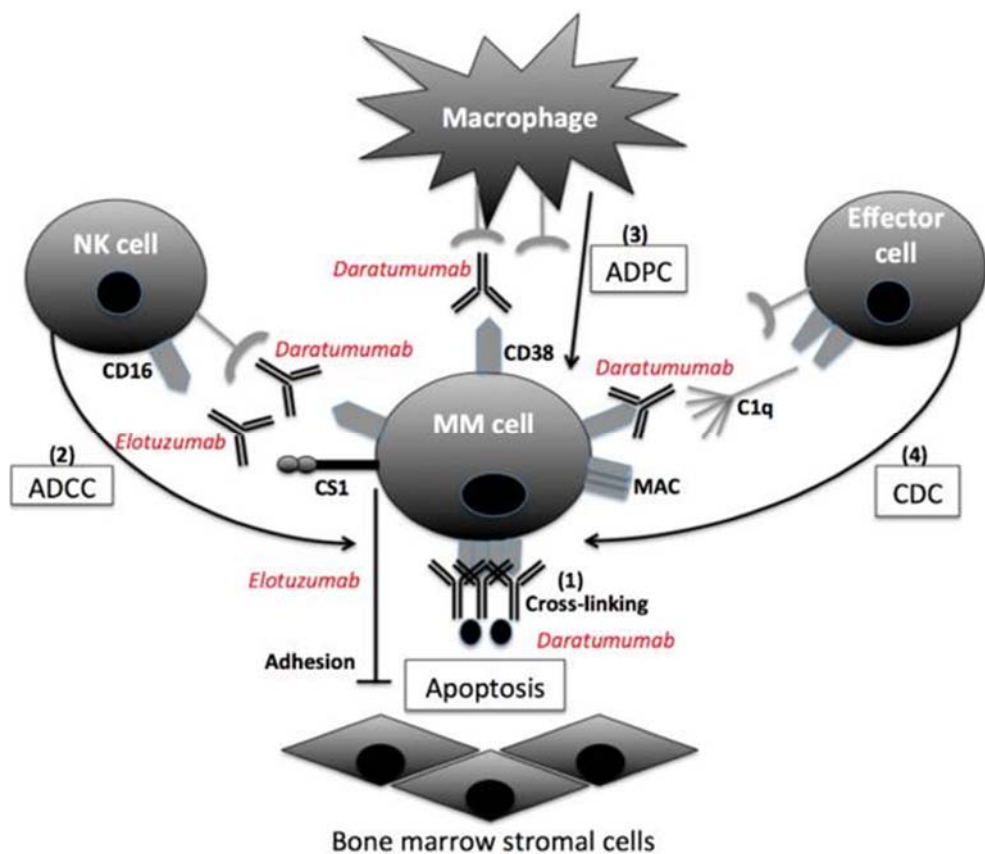
Los AcMo han supuesto una revolución en el tratamiento del cáncer en general y del MM en particular. Dentro de los AcMo destacan los que se dirigen de manera específica frente a antígenos presentes en las células tumorales. Una vez unidos son capaces de desarrollar su efecto antitumoral mediante diversos mecanismos: 1) citotoxicidad directa, 2) citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), 3) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) mediada por células NK y iv) fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) mediada por macrófagos ¹³⁷. Por tanto, una parte muy importante del efecto de los AcMo está mediada por componentes inmunes. En el tratamiento del MM destaca la reciente aprobación de dos AcMo para pacientes en recaída o refractarios: daratumumab (anti-CD38) y elotuzumab (anti-SLAMF7, anteriormente conocido como anti-CS1) (Figura 11).

Daratumumab es un AcMo anti-CD38 que actúa mediante los cuatro mecanismos especificados anteriormente¹³⁸. Su eficacia en pacientes con una media de seis tratamientos previos llevó inicialmente a su aprobación en monoterapia ¹³⁸. Además, recientemente ha demostrado la eficacia en

combinación con lenalidomida y dexametasona ¹³⁹ o con bortezomib y dexametasona ¹⁴⁰, lo que ha llevado a la reciente aprobación de estas combinaciones. Además, otro anti-CD38, isatuximab se está evaluando en pacientes refractarios en diferentes combinaciones.

Respecto a elotuzumab cabe mencionar que en su mecanismo de acción se incluyen la ADCC así como la activación directa de las células NK, al estar presente SLAMF7 (la diana de elotuzumab) tanto en la célula de MM como en la célula NK¹⁴¹. La combinación de elotuzumab con lenalidomida y dexametasona también ha sido recientemente aprobada para su uso en clínica ¹⁴².

Figura 11. Mecanismos de acción de los AcMo daratumumab y elotuzumab (Figura obtenida de ¹⁴³).



3.3. NUEVOS AGENTES EN FASE DESARROLLO PARA EL TRATAMIENTO DEL MM

3.2.1 Otros AcMo y estrategias de inmunoterapia

Recientemente, se ha descrito un mecanismo inmunológico que utilizan las células tumorales para escapar del sistema inmune relacionado con los linfocitos T, la expresión de PD-1; las células de mieloma, al contrario que las células plasmáticas normales, expresan PD-L1 y las células T de pacientes con MM expresan niveles aumentados de PD-1. El eje PD-1/PD-L1 promueve la inhibición del linfocito T ¹⁴⁴. Por ello se han desarrollado AcMo anti PD-1/PD-L1 conocido como el pembrolizumab o el nivolumab que se encuentran en la actualidad en desarrollo clínico.

Por otra parte, se están desarrollando otras estrategias de inmunoterapia como son las basadas en el uso de vacunas antiidiotipos, las combinadas con células dendríticas, el uso de terapia celular NK, así como la inmunoterapia adoptiva mediante CARTs (Chimeric Antigen Receptor T cells) ¹⁴⁵ consistente en linfocitos T del paciente modificados contra el tumor (Figura 12). Esta última estrategia ha mostrado recientemente una eficacia muy significativa en pacientes con MM avanzado, aunque la toxicidad del procedimiento no es desdeñable ¹⁴⁶.

La combinación de estas estrategias de inmunoterapia, asociadas a los nuevos agentes abre aún más las expectativas para el control definitivo del mieloma.

3.2.2 Agentes que actúan sobre vías de supervivencia

3.2.2.1 Inhibidores de la vía Ras/ Raf/ MEK/ ERK

Según estudios de secuenciación masiva recientemente publicados, la vía de señalización que se encuentra mutada con mayor frecuencia en pacientes con MM es la vía de Ras/Raf/MEK/ERK.

Esta vía 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 (Src homology 2 domain containing) 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 vía de señalización. RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) es una familia de genes que codifica para RAF1, ARAF y BRAF ¹⁴⁷. Las quinasas Raf son necesarias para la fosforilación de MEK, y MEK a su vez fosforila a ERK1 y ERK2 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. La proliferación de células mielomatosas inducida por citocinas (IL6, VEGF e IGF1) también está regulada a través de la vía Ras/Raf ¹⁴⁸. Las mutaciones de Ras son muy frecuentes en el MM y su activación requiere la incorporación de un grupo farnesilo. Por ello, los inhibidores de la farnesil transferasa son potencialmente útiles en esta enfermedad. Aunque los resultados en la clínica con este tipo de inhibidores no han sido muy prometedores.

En los últimos años se han evaluado varios inhibidores de MEK para el MM, como selumetinib o trametinib, con eficacia fundamentalmente en pacientes con esta vía activada.

3.2.2.2 Inhibidores de la vía de las PIM kinasas

Las PIM kinasas (PIM-1, PIM-2 y PIM-3) regulan proteínas implicadas en rutas de supervivencia, resistencia farmacológica y migración celular tanto en tumores sólidos como hematológicos. En el caso del MM se sabe que las células mielomatosas expresan elevados niveles de PIM-2, lo que hace que

resulte una diana interesante. Actualmente, está en desarrollo un nuevo pan-inhibidor de PIM kinasas (PIM447) en el mieloma. Estudios preclínicos realizados en nuestro grupo han mostrado que la inhibición de las PIM kinasas mediante el tratamiento con PIM447 reduce de forma importante la viabilidad de las células de mieloma así como su capacidad de migración hacia SDF-1. Asimismo, han demostrado que una de los principales mecanismos de actuación de PIM447 es la inhibición de la vía de proliferación de mTORC1. También se ha observado un importante efecto sinérgico con inhibidores del proteasoma y con agentes inmunomoduladores lo cual podría ser la base para futuros ensayos clínicos ¹⁴⁹.

3.2.2.3 Inhibidores de exportinas

Las exportinas son unas proteínas que median la exportación de moléculas, entre ellas de supresores tumorales como p53, desde el núcleo al citoplasma y que pueden estar implicadas en mecanismos de supervivencia y de resistencia a drogas.

Selinexor, es un inhibidor de exportina 1(XPO-1), que se está evaluando en MM en combinación con dexametasona y otros fármacos como los inhibidores del proteasoma ^{150, 151, 152}. Este fármaco impide que proteínas como p53 salgan del núcleo al citoplasma a través de la XPO-1, permaneciendo así activas y funcionales como supresores tumorales.

3.2.2.4 Inhibidores de Bcl-2

En el MM, el defecto de las vías de muerte celular está frecuentemente causado por un desequilibrio en la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2, presentándose una mayor expresión de proteínas antiapoptóticas que favorecen la supervivencia de la CP tumoral ¹⁵³. Así, Bcl-xL está expresado en la mayoría de las líneas celulares de MM y células de pacientes; en las recaídas se detecta frecuentemente un claro aumento de su expresión, lo que también se correlaciona con la resistencia a la quimioterapia ¹⁵⁴. Mcl-1 parece estar expresado en prácticamente todas las líneas de MM y células frescas de

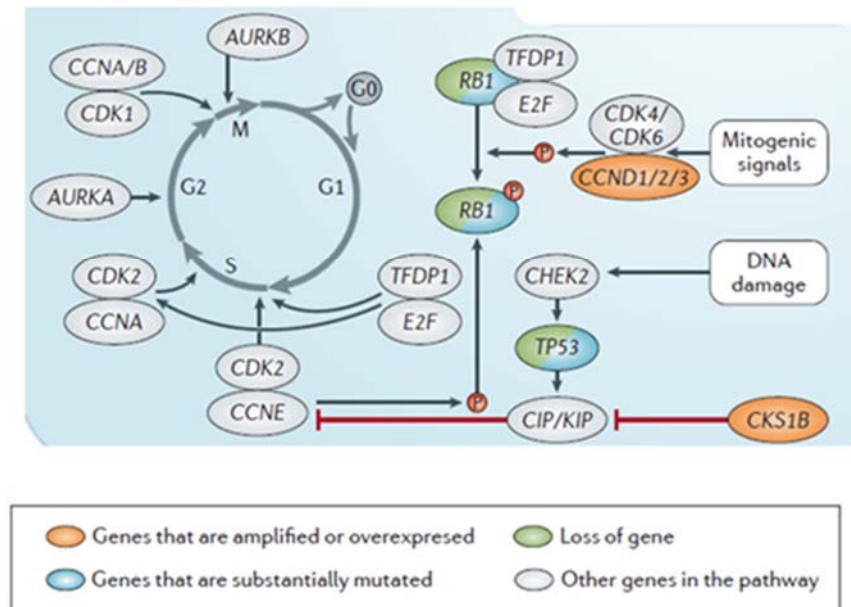
pacientes. Estudios de numerosos grupos han determinado un aumento significativo en la expresión de Mcl-1, al comparar células plasmáticas de enfermos con MM frente a células plasmáticas de donantes sanos^{71, 154-156}. Se ha relacionado la inducción de apoptosis en células mielomatosas con la disminución de la expresión de Mcl-1^{71, 154, 155, 157}. Por último, la expresión del oncogen Bcl-2 desempeña un papel importante en las neoplasias linfoides de línea B¹⁵⁸. La traslocación t(14;18)(q32;q21) da lugar a una expresión anormalmente aumentada de la proteína Bcl-2, que conduce a la inhibición de la muerte celular, contribuyendo a incrementar la supervivencia de las células B y así perpetuar el proceso neoplásico¹⁵⁹. Aunque la t(14;18) es excepcional en pacientes con MM, el gen Bcl-2 está expresado en líneas celulares de MM^{71, 160}, y la expresión aumentada de la proteína se ha detectado con frecuencia¹⁶¹, resultando una diana terapéutica interesante en MM.

En los últimos años se ha desarrollado un fármaco inhibidor de Bcl-2, venetoclax, con eficacia fundamentalmente en pacientes con t(11;14) que presentan niveles elevados de Bcl-2 y más bajos de Mcl-1 y Bcl-xl¹⁶². Este fármaco además se está evaluando en combinación con bortezomib y dexametasona en pacientes refractarios¹⁶³.

3.2.2.5 Inhibidores del ciclo celular

La sobreexpresión de ciclina D es el único evento que, hasta la fecha, unifica la patogénesis del MM. Así, mediante GEP, un 98% de los pacientes con MM presenta sobreexpresión de al menos una de estas ciclinas: CCND1, CCND2 o CCND3. Además, se han identificado otras alteraciones en genes implicados en la progresión del ciclo celular⁸ (Figura 13). Por todo ello, el ciclo celular se presenta como una diana terapéutica particularmente atractiva en MM.

Figura 13. Genes del ciclo celular frecuentemente alterados en CP de mieloma (Figura obtenida de ⁸⁾)



En los últimos años se han desarrollado diferentes agentes anti-mieloma con función inhibidora del ciclo celular, entre ellos, destacan:

- Seliciclib que actúa inhibiendo a las CDK4 y CDK6 que se encuentran activadas al unirse a la ciclina D y permiten la progresión del ciclo a través de G₁. Este fármaco se ha testado en clínica en combinación con bortezomib y dexametasona sin presentar un adecuado balance riesgo/beneficio ^{164, 165}.
- MLN8237 que actúa inhibiendo a la aurora kinasa A, una kinasa mitótica que regula la formación del huso mitótico y la segregación de los cromosomas en anafase. Esta kinasa se ha correlacionado con la amplificación de centrosomas y proliferación en células de MM. Este fármaco también se ha combinado con bortezomib y, al igual que seliciclib, no ha demostrado suficiente eficacia clínica para continuar su desarrollo en MM ¹⁶⁶.

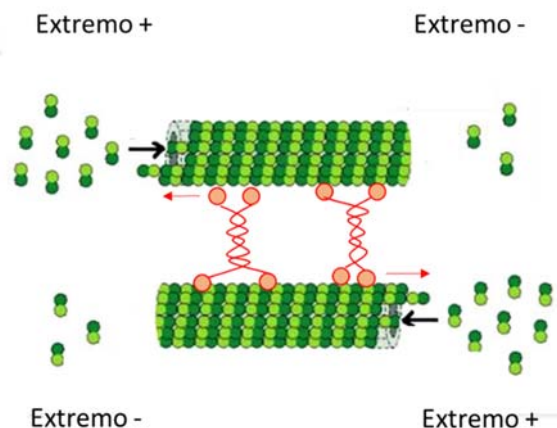
- Filanesib que representa un nuevo agente prometedor para el tratamiento del MM¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ con un mecanismo de actuación novedoso: la inhibición de la kinesin spindle protein (KSP) que se activa únicamente en mitosis y resulta ser esencial para la correcta formación del huso mitótico, y que ha mostrado eficacia en pacientes refractarios¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

4. FILANESIB EN EL MM

4.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE FILANESIB EN EL MM

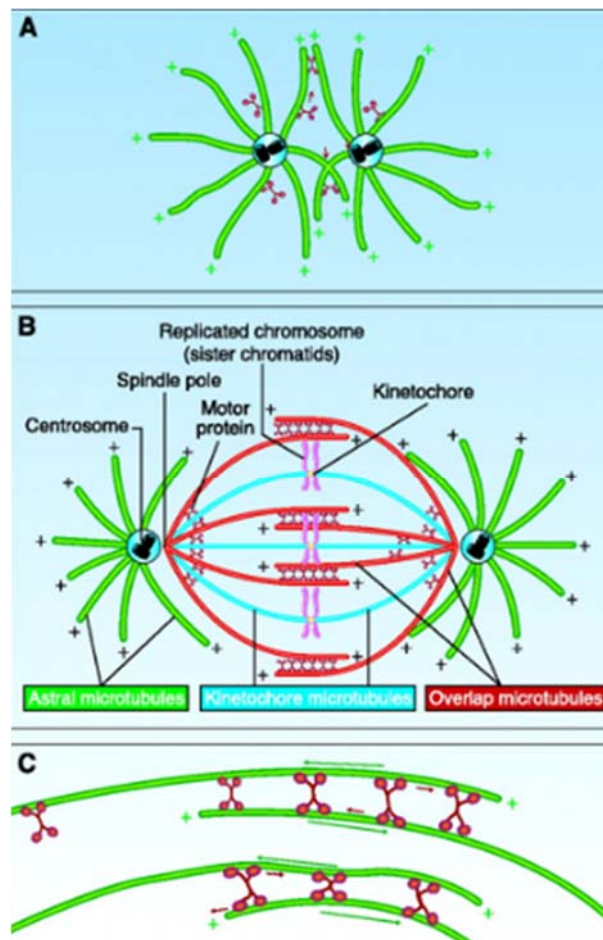
Filanesib, también conocido como ARRY-520, es un fármaco (primero en su clase) que bloquea la proliferación de las células plasmáticas malignas, actuando directa y específicamente sobre la proteína motora de los microtúbulos o kinesina KSP, también conocida como KIF11 o Eg5, que se activa exclusivamente en mitosis. La KSP, al igual que el resto de miembros de la superfamilia de kinesinas (KIF), presenta un dominio motor altamente conservado en el extremo N-terminal que posee actividad adenosín trifosfato y por el que se une a los microtúbulos (Figura 17). Este dominio motor conservado permite a la KSP desplazarse sobre los microtúbulos a la vez que convierten la energía química liberada de la hidrólisis del ATP en energía mecánica.

Figura 17. La estructura homotetramérica bipolar de la KSP (en rojo) permite su unión a los microtúbulos antiparalelos (en verde) y el desplazamiento (flecha en rojo) hacia sus extremos +.



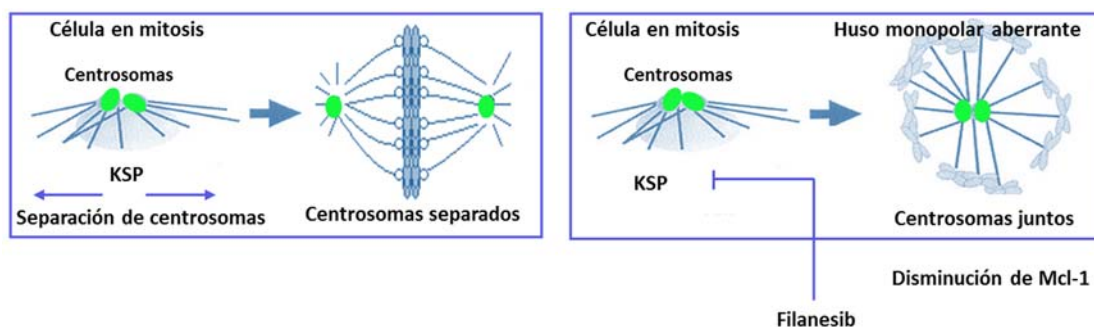
Se requiere la presencia de esta proteína para que se produzca la separación de los centrosomas a ambos polos de la célula para conformar huso mitótico bipolar, en las fases tempranas de la mitosis, lo que da lugar a la formación de un huso bipolar normal ¹⁷⁰(Figura 18).

Figura 18. Separación de centrosomas a ambos polos de la célula y constitución del huso mitótico bipolar mediada por las KSPs (figura obtenida de ¹⁷¹). A) Al inicio de la mitosis (profase) los centrosomas duplicados (en azul) se separan y generan dos estructuras en estrella, los microtúbulos astrales (en verde). Las KSP (en rojo) se mueven hacia los extremos positivos de los microtúbulos y promueven la bipolaridad. B) Durante la metafase se forma un huso bipolar, con los cromosomas (en rosa) alineados en el ecuador de dicho huso. C) Se muestra el movimiento de las KSP hacia los extremos positivos de microtúbulos antiparalelos.



La inhibición de la separación de los centrosomas conlleva la formación de un huso monopolar aberrante que promueve la activación del SAC que conduce a la interrupción de la mitosis ¹⁷². En este punto la célula activa mecanismos para resolver la formación anómala del huso; al no conseguir resolver esta disfunción y al presentar una interrupción sostenida de la mitosis, se produce la activación de rutas apoptóticas y la consiguiente muerte celular ¹⁷³. La rápida aparición de la muerte celular en mitosis tras la exposición a filanesib viene determinada por la capacidad de la célula para degradar proteínas que promueven la supervivencia celular, como los miembros de la familia de Bcl-2 ¹⁷⁴. Se ha visto que, en el mieloma múltiple, la supervivencia celular depende de la proteína antiapoptótica Mcl-1, miembro de la familia Bcl-2, que no se sintetiza en mitosis y tiene una semivida de unas pocas horas ¹⁷⁵, ¹⁷⁶. La interrupción prolongada de la mitosis, como consecuencia de la inhibición de la KSP, posibilita que se dé una reducción significativa de la concentración de Mcl-1, de tal forma que puedan activarse las vías que conducen a la muerte celular ¹⁷⁴ (Figura 19).

Figura 19. Mecanismo de acción de filanesib en el MM.



Habitualmente, la supervivencia de las células no hematológicas depende de proteínas antiapoptóticas diferentes, que también pertenecen a la familia Bcl-2 ¹⁷⁶. Por lo general estas proteínas presentan una semivida más prolongada, lo que posibilita que en estas células la mitosis se reinicie antes de que se induzca la muerte celular. Por lo tanto, generalmente la toxicidad de

filanesib se limita a acontecimientos de tipo hematológico, generalmente neutropenia.

Además, este fármaco al inhibir específicamente a la KSP, una proteína que actúa exclusivamente en mitosis, no induce neurotoxicidad; a diferencia de los agentes anti-mitóticos clásicos (entre los que se encuentra la vincristina utilizada en el tratamiento del MM) que resultan ser poco selectivos al inhibir la dinámica de los microtúbulos (implicados en múltiples mecanismos celulares, como las sinapsis neuronales).

4.2. FILANESIB EN LA CLÍNICA DEL MM

Tras la realización de dos ensayos de fase I en los que se evaluó la eficacia de filanesib en tumores sólidos y leucemia mieloide aguda (LMA), se llevó a cabo el ensayo clínico ARRAY-520-212 que exploró la eficacia y seguridad de la administración de filanesib en monoterapia y en combinación con dexametasona en pacientes con MM. Los pacientes que se incluyeron en dicho estudio habían recibido una mediana de seis tratamientos previos en la cohorte de filanesib en monoterapia y una mediana de ocho tratamientos previos en la cohorte de pacientes que recibieron filanesib con dexametasona. En ambos grupos de tratamiento un 16 % de los pacientes respondieron. La mediana de supervivencia libre de evento (definida como el tiempo transcurrido hasta que el paciente reciba un nuevo tratamiento o fallezca, lo que acontezca primero), fue aproximadamente de 3,5 meses. Dos pacientes (2%) han permanecido en el estudio durante más de 2,5 años ^{167, 168}.

Basado en estos datos, a continuación, se evaluó la eficacia de filanesib en combinación con otros tratamientos anti-MM. Así, hasta la fecha de inicio del trabajo de investigación de la presente tesis doctoral, filanesib se estaba evaluando en un estudio de Fase I, en combinación con bortezomib, con o sin la administración de dexametasona ¹⁷⁷ y en combinación con carfilzomib ¹⁷⁸,
¹⁷⁹.

4.3. INFLUENCIA DE LA ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA HUMANA (AAG) SOBRE LA EFICACIA DE FILANESIB EN EL MM

Las principales proteínas que se unen a fármacos en el plasma son la alfa-1 glicoproteína ácida humana (AAG) y la albúmina. Ambas tienen la capacidad de modificar significativamente los parámetros farmacocinéticos y la eficacia de los fármacos, al reducir la fracción libre de los mismos. En particular, en los fármacos que se administran por vía intravenosa (como filanesib) con frecuencia la unión a las proteínas plasmáticas constituye el primer paso que controla la distribución del fármaco. Estudios *in vitro* han demostrado que filanesib exhibe una alta afinidad por la AAG (constante de disociación media [Kd] = 1 μ M) que es muy superior a la que presenta por la albúmina sérica humana HSA (Kd media = 388 μ M)¹⁶⁷. Por lo tanto, es razonable suponer que en caso de que el paciente presente una alta concentración plasmática de AAG, ello puede conllevar una menor fracción libre de filanesib, y por lo tanto afectar a la eficacia del fármaco.

En el contexto del estudio clínico ARRAY-520-212 se recogieron muestras basales de suero de pacientes tratados con filanesib y se cuantificó la cantidad de AAG utilizando un ensayo inmunoturbidimétrico comercializado (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Reino Unido). De forma muy interesante, los pacientes cuya concentración basal de AAG se situó por encima de un punto de corte determinado de forma retrospectiva (1,10 mg/L) tendieron a interrumpir su participación en el estudio de forma más prematura en comparación con los pacientes cuya concentración basal de AAG se situó en este punto de corte o por debajo de este, lo que se asoció con una menor mediana de la supervivencia global (3,0 y 19,1 meses; $p < 0,001$). Por otra parte, no se observó ninguna respuesta clínica objetiva en los pacientes que presentaron concentraciones de AAG por encima de este punto de corte, en comparación con un 22% de respuestas objetivas en pacientes con concentración basal de AAG ≤ 1.1 mg/L^{167, 168}.

Actualmente, la interferencia por parte de la AAG, que se plantea como hipótesis es el secuestro del fármaco por esta proteína. Aunque se desconoce el mecanismo exacto de esta interacción y si interfiere en la eficacia de otros fármacos anti-mieloma ¹⁶⁸.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

En los últimos años hemos asistido a una revolución en el tratamiento de los pacientes con MM, ya que, sin abandonar la utilización de esquemas basados en la quimioterapia convencional, se han desarrollado numerosos nuevos agentes dirigidos frente a dianas específicas de la célula tumoral. Así, son innumerables los agentes estudiados preclínicamente; muchos de ellos con diferentes mecanismos de actuación, han sido evaluados clínicamente en ensayos fase I, II o incluso III. Sin embargo, tan solo tres familias de fármacos y dos tipos de anticuerpos monoclonales han sido aprobados por las agencias reguladoras. Este es el caso de los inhibidores de proteasoma (bortezomib, carfilzomib e ixazomib), los agentes inmunomoduladores (talidomida, lenalidomida y pomalidomida), el inhibidor de histona deacetilasa (panobinostat) y los anticuerpos monoclonales (el anti-CD38, daratumumab y el anti-SLAMF7 elotuzumab). Estos agentes han mejorado sustancialmente la supervivencia de los pacientes. A pesar de ello, el MM sigue siendo una enfermedad incurable para la mayoría de los pacientes. De hecho, no todos los pacientes responden a estos tratamientos y entre los que lo hacen, la mayoría acaban recayendo y haciéndose resistentes en última instancia. Por este motivo, es especialmente importante buscar nuevos agentes dirigidos a nuevas dianas terapéuticas que, tanto solos como en combinación, rescaten a estos pacientes. Filanesib (Arry-520) se ha presentado como un fármaco con un nuevo mecanismo de actuación, cuya acción es la inhibición de la KSP, proteína necesaria para la correcta formación del huso mitótico y su eficacia es muy dependiente de la proteína antiapoptótica Mcl-1. Así tumores que dependen de esta proteína para su supervivencia son especialmente sensibles a filanesib. Este fármaco ha demostrado eficacia en pacientes con MM que han sido previamente resistentes a todos los tratamientos y que no tienen ninguna alternativa terapéutica. Por otra parte, el MM es una enfermedad poligénica y, posiblemente por eso, los fármacos dirigidos, frecuentemente no tienen actividad suficiente como agentes únicos y deben ser combinados entre sí o con otros tratamientos estándar para conseguir un efecto sinérgico y obtener un beneficio clínico. La validación preclínica de filanesib mediante estudios *in vitro* e *in vivo* supondría un paso clave para el mejor conocimiento del

mecanismo de actuación de este fármaco y el posterior desarrollo de ensayos clínicos más eficaces, bien direccionando el tratamiento para un determinado grupo de pacientes o bien combinándolo con agentes que potencien su eficacia.

Los fármacos inmunomoduladores, talidomida, lenalidomida y pomalidomida, representan en la actualidad, uno de los esquemas claves en el tratamiento del MM. Así, la combinación de pomalidomida con dexametasona es una terapia estándar que ha mostrado eficacia en los pacientes refractarios. En los últimos años, este tratamiento se ha convertido en un paradigma al que se han asociado nuevos fármacos con nuevos mecanismos de actuación con el objetivo de mejorar sus resultados. Así, la evaluación comparativa del posible efecto sinérgico de filanesib con diferentes IMiD (talidomida, lenalidomida, pomalidomida) y con dexametasona en modelos preclínicos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de MM permitiría identificar la combinación más sinérgica, conocer el mecanismo de la misma, e identificar biomarcadores predictores de respuesta. Todos estos datos, aportarían las bases necesarias para el diseño de un ensayo clínico. Por otra parte, una característica interesante de filanesib es que presenta un biomarcador de resistencia al mismo, ya que aquellos pacientes con niveles plasmáticos elevados de alfa-1 glicoproteína ácida (AAG) no mostraron ninguna respuesta. Actualmente, se desconoce si la AAG activa vías de resistencia en las células de mieloma o es un biomarcador de resistencia exclusivo de este nuevo agente terapéutico. La evaluación preclínica de esta interacción podría ayudar a comprender el mecanismo de la misma y, a su vez, podría ayudar a predecir sensibilidad o resistencia a diferentes terapias antimieloma y avanzar así hacia una medicina personalizada identificando el grupo de pacientes que podrían beneficiarse con estos tratamientos y mejorando su calidad de vida. En base a estas hipótesis, en la presente tesis doctoral se plantean los siguientes objetivos.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL 1. Estudiar el efecto y el mecanismo de acción del nuevo inhibidor de la KSP, filanesib, sobre las células de mieloma, mediante estudios *in vitro* e *in vivo*.

- OBJETIVO ESPECÍFICO 1. Estudiar la posible implicación de la proteína KSP, diana terapéutica de filanesib, en la supervivencia de los pacientes con MM.
- OBJETIVO ESPECÍFICO 2. Estudiar el efecto *in vitro* de filanesib en líneas celulares de mieloma mediante el análisis de la viabilidad celular, la apoptosis, el ciclo celular, así como, su mecanismo de acción mediante estudios de Western Blot.
- OBJETIVO ESPECÍFICO 3. Estudiar el efecto anti-MM *in vivo* de filanesib en un modelo de plasmocitoma subcutáneo en ratones SCID.

OBJETIVO GENERAL 2. Estudiar de manera comparativa la eficacia y el mecanismo de acción de filanesib en combinación con diferentes IMiD (talidomida, lenalidomida y pomalidomida) y dexametasona, sobre las células de mieloma, seleccionando la combinación más prometedora para su evaluación preclínica.

- OBJETIVO ESPECÍFICO 1. Estudiar el efecto de filanesib en combinación con diferentes IMiD (talidomida, lenalidomida y pomalidomida) y dexametasona y filanesib sobre la viabilidad celular, la apoptosis y el ciclo celular.
- OBJETIVO ESPECÍFICO 2. Estudiar el efecto de filanesib en combinación con diferentes IMiD (talidomida, lenalidomida y pomalidomida) y dexametasona en células de pacientes con mieloma mediante el análisis de la apoptosis.

- OBJETIVO ESPECÍFICO 3. Estudiar *in vivo* en un modelo de plasmocitoma subcutáneo en ratones SCID el efecto de filanesib en combinación con diferentes IMiD (talidomida, lenalidomida y pomalidomida) y dexametasona.
- OBJETIVO ESPECÍFICO 4. Estudiar *in vitro* e *in vivo* el mecanismo de acción de la combinación más prometedora resultante de los experimentos anteriores.

OBJETIVO GENERAL 3. Evaluar preclínicamente el papel de AAG como posible biomarcador de respuesta en el MM.

- OBJETIVO ESPECÍFICO 1. Evaluar la influencia de altos niveles de AAG sobre la eficacia preclínica de filanesib.
- OBJETIVO ESPECÍFICO 2. Evaluar el posible efecto biológico de AAG sobre las células de MM analizando la apoptosis, el ciclo celular y el mecanismo de acción por Western Blot.
- OBJETIVO ESPECÍFICO 3. Evaluar la influencia de altos niveles de AAG sobre la eficacia preclínica de otros agentes en monoterapia utilizados en la clínica habitual del MM.
- OBJETIVO ESPECÍFICO 4. Estudiar el efecto de pomalidomida con dexametasona y filanesib en líneas celulares de mieloma mediante el análisis de la viabilidad celular.
- OBJETIVO ESPECÍFICO 5. Analizar la capacidad de AAG para secuestrar filanesib.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CÉLULAS

1.1 LÍNEAS CELULARES

Respecto a las líneas celulares de MM que se utilizaron. MM1.S, U266 y NCIH-929 se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), mientras que RPMI-8226, JLN3 y OPM-2 se obtuvieron de la DMSZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany). RPMI-8226-LR5, U266DOX4 y U266LR7 fueron donadas por el Dr. W. S. Dalton (Moffitt Cancer Center, Tampa, FL, USA) ¹⁸⁰. La línea celular MM.1R fue donada por el Dr. S. T. Rosen (Northwestern University, Chicago, IL, USA). La línea celular MM144 fue donada por el Dr.S. Rudikoff (National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). 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). La identidad y autenticidad de las líneas fue validada mediante análisis STR (short tandem repeat), utilizando el kit PowerPlex 16 HS System de Promega y utilizando el análisis online STR matching analysis (DSMZ institute; <http://www.dsmz.de/fp/register.php>). Todas ellas se cultivaron en atmósfera húmeda en presencia de 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C, en medio RPMI1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 10% de suero bovino fetal inactivado (SBF), antibióticos (penicilina a 100 U/ml y estreptomycin 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 5 (MM).

Tabla 5. Líneas celulares humanas de mieloma múltiple (LCHMM), su sensibilidad a drogas y/o sus características citogenéticas y/o.

| LCHMM | Características |
|-----------|---|
| MM.1S | - Sensible a dexametasona - t (14; 16) |
| MM.1R | - Resistente a dexametasona - t (14; 16) |
| MM.1S-luc | - Sensible a dexametasona - Expresa luciferasa y GFP |
| OPM-2 | - Delección en PTEN (Activación constitutiva de AKT) - t (4; 14) - del17p |

| | |
|----------------------|---|
| U266 | - Cariotipo hipodiploide - del17p |
| U266LR7 | - Parcialmente resistente a melfalán |
| U266DOX4 | - Parcialmente resistente a doxorubicina |
| RPMI-8226 | - Ganancia 14 q - t (16; 22) |
| RPMI-8226-LR5 | - Parcialmente resistente a melfalán |
| JJN3 | - t (14; 16) y activación de c-MAF |
| NCI-H929 | - Sensible a dexametasona - Cariotipo hipodiploide |
| MM-144 | - Muy sensible a fármacos |

1.2 CÉLULAS DE PACIENTES

Las células procedentes de pacientes se obtuvieron a partir de aspirados de médula ósea (MO). 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 incubaron a 37°C en atmósfera húmeda en presencia de 5% de CO₂ y 95% de aire durante 48 horas en medio RPMI1640 suplementado con penicilina, estreptomycinina y con un 20% de SBF, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de los fármacos en estudio.

2. FÁRMACOS Y CONTROLES

- **Filanesib (ARRY-520).** El inhibidor de la kinesin spindle protein fue provisto por la farmacéutica Array BioPharma Inc (Boulder, CO, USA). Con él se realizaron estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. El vehículo que se utilizó en las células control en cultivos *in vitro* y *ex vivo* fue el DMSO (Dimethyl sulfoxide). En los ratones control fue PBS al 20% de DMSO.
- **Talidomida, lenalidomida y pomalidomida.** Estos fármacos fueron adquiridos de la empresa Selleckchem (Houston, TX, USA). Con ellos se realizaron estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. El vehículo que se utilizó en las células control en cultivos *in vitro* y *ex vivo* fue el DMSO. En los ratones control fue PBS al 20% de DMSO.

- **Dexametasona.** Este fármaco fue adquirido de la empresa Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Con él se realizaron experimentos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. El vehículo que se utilizó en las células control en cultivos *in vitro* y *ex vivo* fue el etanol. En los ratones control fue PBS.
- **Bortezomib.** El fármaco se adquirió de LC Laboratories (Woburn, MA, USA). Con él se realizaron estudios *in vitro*. El vehículo que se utilizó en las células control en cultivos *in vitro* fue el DMSO.
- **Melfalán.** El fármaco se adquirió de de la empresa Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Con él se realizaron experimentos *in vitro*. El vehículo que se utilizó en las células control en cultivos *in vitro* fue el etanol.

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 ¹⁸¹.

Reactivos

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

Procedimiento

1. Se sembraron 3×10^4 células (100 μ l/pocillo) en placas de 96 pocillos.

2. Después del tratamiento con cada fármaco a diferentes concentraciones y/o tiempos, se añadieron 11 μ l de MTT a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas a 37°C.
3. Se añadieron 110 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 las 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 MM¹⁸².
6. La absorbancia se midió en un lector de placas (TECAN, Männedorf, ZH, Switzerland), con λ de lectura a 570 nm y 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 MM.1S-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 laboratorio¹⁸³. 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, MM.1S-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-GFPluc en medio RPMI1640 con SBF al 10%.
3. El co-cultivo se trató durante 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 μ g / 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, Inc., Hopkinton, MA, USA).

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 realizaron dos tipos de ensayos según el fluorocromo empleado para cuantificar el contenido del ADN, y por tanto, identificar las diferentes fases del ciclo celular (el fluorocromo hidrofílico Ioduro de propidio o el fluorocromo liposoluble DRAQ5). Para ambos estudios 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.

Procedimiento utilizando Ioduro de propidio

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 μ l 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 μ g de ioduro de propidio (IP) y 0,5 mg de RNasa A y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad.

Procedimiento utilizando DRAQ5

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 200 μ l de PBS.
3. Se añadieron (5 minutos antes de la adquisición en el citómetro) 2.5 μ L de DRAQ5 y se homogenizó la mezcla.

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

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 celular¹⁸⁴. En condiciones normales, en la célula, 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. Si en lugar de la adición adicional de IP, se añade DRAQ5 a las células, otro fluorocromo que marca el ADN y que, por su naturaleza lipofílica, es capaz de atravesar las membranas celulares y teñir a células vivas y muertas, se pueden diferenciar las células que están en apoptosis en diferentes fases del ciclo celular.

Reactivos

- Human Annexin V-FITC (Immunostep, Salamanca, Spain), que contiene Anexina, IP (20 µg/ml) y tampón de unión (Hepes/NaOH, 10 mM, pH 7,4, NaCl, 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM).
- Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) (Gibco).

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 CaCl₂ y MgCl₂ 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 para estudios de apoptosis temprana y tardía o 2.5 µl de la solución de DRAQ5 (5 minutos antes de la adquisición) para estudios de apoptosis en diferentes fases del ciclo celular.

6. Por cada condición se adquirieron un total de 30.000 eventos en un citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el programa CellQuest (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Para el análisis fenotípico se utilizó el programa Infinicyt (Cytognos S.L., Salamanca, Spain).

6.2. CÉLULAS DE PACIENTES

1. Lisis: la población total de células obtenidas de aspirados de MO 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 RPMI 1640.
4. Se cultivaron en RPMI1640 con 20% de SBF.
5. Se plaquearon 4 x 10⁵ células por pocillo en 1 ml de medio y en placas de 6 pocillos.
6. Se añadió cada fármaco y se incubó 48 horas.
7. Se recogieron las células y se lavaron con 1 ml de PBS.

- 2 **Marcaje.** Para diferenciar las CP y linfocitos del resto de los linajes de la MO se realizó un marcaje multiparamétrico basado en la combinación de Anexina V-FITC y dos anticuerpos monoclonales contra los antígenos CD38 y CD56 asociados a las CP y un anticuerpo monoclonal contra el antígeno CD45 asociado a los linfocitos.

Reactivos

- Anti-CD45-APC, anti-CD56-PE y anti-CD38-PerCP/Cy5 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).
- Anexina V-FITC (Immunostep, Salamanca, Spain).

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, Franklin Lakes, NJ, USA). Para el análisis fenotípico se utilizó el programa Infinicyt (Cytognos S.L., Salamanca, Spain).

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 ($\Delta\psi_m$). Para evaluarla, se realizaron dos tipos de ensayos según el fluorocromo catiónico empleado, DIOC6₍₃₎ (3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide) o el fluorocromo TMRE (tetrametilrodamina metil ester), ambos se incorporan 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, Eugene, OR, USA).
- TMRE (Invitrogen Corporation, Gaithersburg, MD, USA).

Procedimiento con DiOC₆₍₃₎

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, Franklin Lakes, NJ, USA). Para el análisis de los datos se utilizó el programa Paint A Inficinty (Cytognos S.L, Salamanca, Spain).

Procedimiento con TMRE

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 TMRE 500 nM, durante 20 min, a 37°C, en oscuridad.
4. Se lavaron con PBS.

A continuación, se procedió a la medida de la fluorescencia emitida por el TMRE correspondiente al potencial mitocondrial utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur y el programa CellQuest (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Para el análisis de los datos se utilizó el programa Paint A Infcinty (Cytognos S.L, Salamanca, Spain).

8. INMUNOFLUORESCENCIA

8.1 FORMACIÓN DE HUSOS MONOPOLARES.

Para estudiar la formación de husos monopolares *in vitro* se utilizaron 700.000 células por condición de tratamiento (700.000 células/ml).

Reactivos

- Poli-Lisina (0.1 mg/ml en agua destilada) estéril y conservada a 4°C.
- Metanol a -20°C.
- PBS al 2% de BSA.
- Solución de lavado TBST.
- Anticuerpo primario anti- α tubulina (Calbiochem).
- Anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Life Technologies, Waltham, MA, USA).
- Solución 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) (1 mg/ μ l) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

Procedimiento

1. Se añadió 1 ml de poli- Lisina sobre un cubreobjetos estéril.

2. Tras 30 minutos en contacto con el cubreobjetos, se retiró por aspirado al vacío la poli-Lisina sobrante.
3. Se añadió sobre el cubreobjetos 1 ml de la suspensión celular previamente homogenizada.
4. Se incubaron las células en atmósfera húmeda en presencia de 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C.
5. A las 24 horas de cultivo se trataron a las células con las distintas condiciones experimentales y tiempos.
6. Se fijaron las células en metanol durante 5 minutos a -20°C.
7. Se bloquearon en PBS al 2 % BSA durante 1 hora a temperatura ambiente.
8. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBST.
9. Se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C.
10. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBST.
11. Se añadió el anticuerpo secundario y se dejó incubando en el balancín durante 1 hora a temperatura ambiente.
12. Se añadió el DAPI justo antes de visualizar en el microscopio de fluorescencia.

9. WESTERN BLOT

9.1 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 (Ethylenediaminetetraacetic acid) 10 mM, glicerol 10%, Nonidet P-40 1%, Tris pH 8,0 20 mM, PMSF

(phenylmethylsulfonyl fluoride) 1mM, pepstatina 1 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/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.

9.2 Cuantificación proteica de los extractos celulares

Se utilizó el método diseñado por Bradford ¹⁸⁵.

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.

9.3 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 ¹⁸⁶.

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 desnaturizante 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.

9.4 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 N₃Na 0.05%).
- Tampón de lavado TBST (10 mM Tris pH 7,4; NaCl 150 mM; Tween 20 0,1%).
- Anticuerpos primarios: anti-MCL-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA); anti-Caspasa-3, anti-Caspasa-7, anti-Caspasa 9, anti-AIF, anti-BCL-XL, anti-PARP, anti-BCL-2, anti-BAD, anti-BAK, anti-BAX, anti-Ciclina B1, anti-pHH3, anti-Actina (Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA); anti-Citocromo-C (Calbiochem, San Diego, CA, USA).
- Anticuerpos secundarios: IgG anti-conejo-HRP e IgG anti-ratón-HRP (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).
- 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.

9.5 Extracción proteica de las fracciones citosólica, mitocondrial y nuclear

Reactivos

- Tampón de lisis de homogenización (LH): 20 mM Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) pH 7,5; Mg Cl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM; EDTA 1 mM; EGTA (ethyleneglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) 1 mM; DTT (Dithiothreitol) 1 mM; Sacarosa 250 mM; PMSF 1mM; pepstatina 1 µg/ml; aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, sodio ortovanadato 1 mM.

Procedimiento

1. Se recogieron y centrifugaron las células (30 x 10⁶ de células por tratamiento (1 x 10⁶ 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.

10. ESTUDIOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE siRNAs

Las moléculas de ácido ribonucleico de cadena corta, que forman parte del mecanismo de ARN de interferencia (RNAi, siglas en inglés), son secuencias de ribonucleótidos que regulan la expresión a nivel traduccional de genes eucariontes. El silenciamiento génico mediado por RNAi, se refiere al proceso que permite, mediante complementariedad entre una molécula de ARN de interferencia y un ARN transcrito, promover la degradación de este último así como la reducción de sus niveles de traducción. Existen dos clases principales de moléculas ARN reguladoras que llevan a cabo dicho fenómeno: ARN de interferencia corto (siRNA) y microARN (miRNA). Ambas son generadas a partir

De la rotura de monómeros de ARN de doble cadena por una enzima ribonucleasa denominada DICER perteneciente a la familia de las ARNasas III,

que genera fragmentos entre 17-25 nucleótidos. A nivel transcripcional, el ARN de interferencia promueve un complejo proceso de metilación de ADN (adición de un grupo metilo a la molécula), el cual conduce a una transformación de la eucromatina en heterocromatina en una posición fija del cromosoma (locus). A nivel post-transcripcional, el fenómeno de silenciamiento se origina mediante la intervención de una molécula de RNAi. El complejo de silenciamiento ARN-inducido (RISC) resultante permite la vinculación al ARN mensajero (mRNA) diana y mediar su degradación o inhibir la traducción de proteínas.

Equipo y reactivos

- Nucleofector II system (Lonza, Allendale, NJ, USA).
- Medio RPMI1640 (R0).
- Medio RPMI1640 al 10% de FBS (R10).
- siRNA control o (NT): Non- targeting control short interfering RNA (NT-siRNA) (D-001810-10-20; Dharmacon Research Inc. Lafayette, CO, USA) conservados a -20°C
- siRNA problema o (Bax siRNA): Bax siRNA ON TARGET plus SMART pool siRNA (reference: L-003308-01-0010; Dharmacon Research, Inc., CO, USA) conservados a -20°C

Procedimiento

1. Se calentaron a 37°C dos tubos de 15 ml, uno con R0 y otro con R10.
2. Se centrifugaron las células problema a 161 g (1200 r.p.m.) y se retiró su medio de cultivo.
3. Se añadieron 400µl de R0 en las células y se homogenizó la muestra.
4. Se pasó la suspensión celular a un eppendorf RNasa free y se añadieron 4 µl de cada SiRNA según el eppendorf problema, el control (NT) o Bax siRNA.
5. Se añadieron 1,6 ml de R10 por condición en una placa de 6 pocillos.
6. Se añadieron 100 µl de la suspensión celular con siRNA a una cubeta del nucleofector.

7. Se transfectaron las células en el Cell line Nucleofector Kit V utilizando el programa adecuado (por ejemplo, G16 para la línea celular MM.1S).
8. Se añadieron 500 μ l de R10 a la cubeta y con ayuda de una pipeta pasteur estéril se sembró la suspensión celular en la placa de 6 pocillos.
9. Se incubaron las células en atmósfera húmeda en presencia de 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C el tiempo necesario.
10. Se recogieron las células para análisis y para confirmación del silenciamiento por Western Blot. Las células transfectadas con NT deberían mostrar los niveles normales de la proteína problema y las células transfectadas con siRNA Bax no deberían dar señal o al menos debería ser muy baja para la proteína problema.

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 Calcsyn (Biosoft, Ferguson, MO, USA), basado en el método de Chou-Talalay¹⁸⁷ y que calcula un índice de combinación (IC) con la siguiente interpretación:

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

12. MODELO MURINO 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, Franklin Lakes, NJ, USA). Cuando los tumores se hicieron palpables o alcanzaron el tamaño deseado, 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 $p < 0.05$.

13. 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 los anticuerpos se realizó con el sistema semi-automático Dako Autostainer (Dako América del Norte, Carpinteria, CA). El anticuerpo primario utilizado fue anti-BAX (Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA). 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.

Sobre los microarrays de TMA desparafinados también se realizó el ensayo Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) para identificar la fragmentación nuclear característica de la apoptosis, utilizando el kit *In Situ* Cell Death Detection (Roche, Mannheim, Germany). Las secciones se contrastaron con DAPI y se analizaron por microscopía de fluorescencia (Leica TCS SP2).

14. MICROARRAYS DE ARN.

Se analizaron los cambios inducidos por los diferentes fármacos en los perfiles de expresión génica de las células mielomatosas al inicio de la muerte celular, y por tanto, cuando las células todavía son viables y mantienen un ARN de buena calidad. Para ello se realizaron estudios de tiempo-respuesta con Anexina /IP con el fin de determinar las condiciones que inducían un mínimo de apoptosis (15 %) con cada fármaco.

14.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ARN TOTAL.

Se congelaron 107 células en 350 µl de tampón RLT plus (Qiagen) a -80°C. Para mejorar la calidad del ARN y asegurar una mejor hibridación sobre los microarrays de Affymetrix®, Se realizó la purificación del RNA mediante las columnas "RNeasy® Mini", (Qiagen).

Procedimiento:

1. Se añadieron 250 µl de etanol 100% y se homogenizó la mezcla.
2. Se pasó el volumen total a una columna de purificación.
3. Se centrifugó a 9.000 g durante 15 segundos.
4. Se lavó con 500 µl de solución RPE.
5. Se centrifugó a 9.000 g durante 15 segundos.

6. Se repitió el lavado con RPE.

7. Se añadió 30 µl de agua DEPC, y se pasó el ARN a un tubo nuevo.

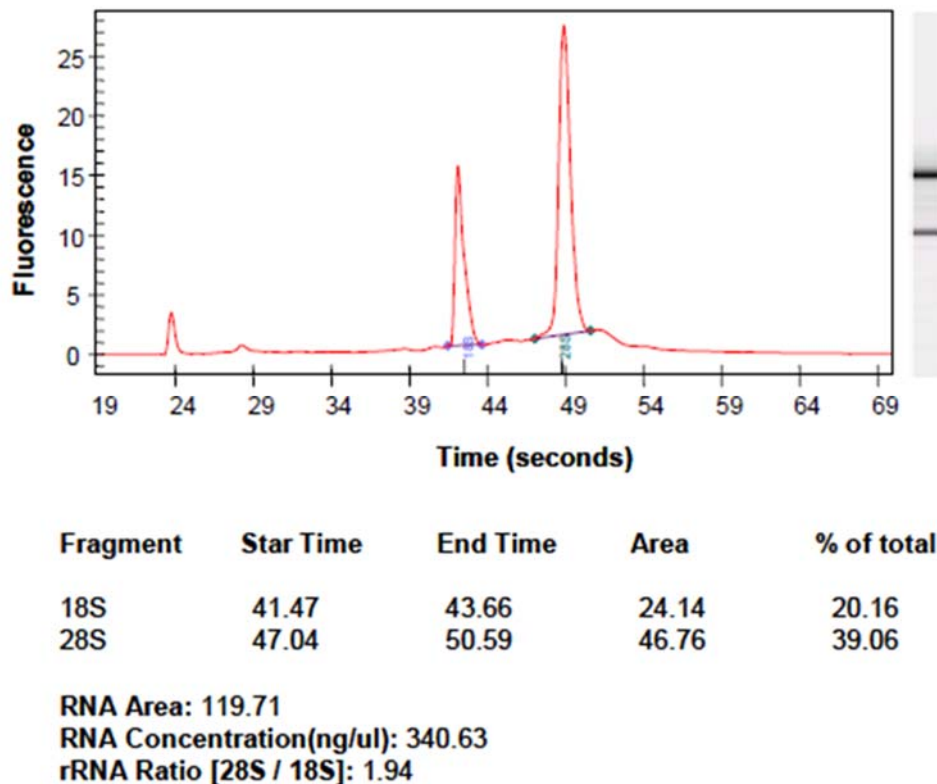
14.2. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN Y CALIDAD DEL ARN.

La evaluación de la integridad del ARN es un paso crítico en los análisis de la expresión génica. Para medir la concentración y al mismo tiempo valorar la calidad del ARN, se utilizó el sistema de Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) con el kit “RNA 6000 Nano LabChip”, en el que se pueden medir hasta 12 muestras (1 µl por cada una) en un rango de concentración entre 25 y 250 ng/µl.

Para cada muestra el bioanalizador calcula automáticamente la relación entre las áreas de las bandas ribosomales 28S y 18S, que idealmente debe estar entre 1,8 y 2,1. Este valor puede ser utilizado como un parámetro de la calidad de la muestra. La variación de esta ratio puede indicar degradación parcial de la muestra o contaminación de la misma. En los casos de completa degradación las bandas llegan a desaparecer.

Los picos más diferenciados y de mayor tamaño se corresponden con las fracciones ribosómicas 18S y 28S. La línea entre 29 segundos y la fracción 18 S ha de ser prácticamente recta y los picos pequeños corresponden a pequeñas moléculas de ARN (Figura 20).

Figura 20. Cuantificación del ARN y determinación de su calidad.



14.3. PROCEDIMIENTO DESARROLLADO DEL ARRAY DE AFFYMETRIX HUMAN GENE 2.0 ST

Para todo este proceso se siguieron las recomendaciones de la casa comercial comercial (Ambion WT Expresión kit (Ambion, P/N 4411974).

14.3.1. Preparación de las diluciones de controles Poly-A

Se prepararon diluciones de los controles Poly-A en función de la cantidad de ARN total de partida.

14.3.2. Síntesis primera cadena ADNc (1º Ciclo)

1. Se preparó la siguiente mezcla (multiplicando las cantidades por el número de muestras a procesar): First Strand Buffer Mix 4µl y First Strand Buffer Enzyme 1µl.

2. Se mezclaron y añadieron 5 µl a cada tubo de con ARN total + Poly-As. Se incubaron las muestras en el termociclador según el siguiente protocolo: 25°C 60 min; 42 °C 60 min; 4 °C 2 min.

14.3.3. Síntesis segunda cadena ADNc (1°Ciclo):

1. Se preparó la siguiente mezcla (multiplicando las cantidades por el número de muestras a procesar): Agua nucleasa free 32,5 µl, Second Strand Buffer Mix 12,5 µl y Second Strand Buffer Enzyme 5 µl.
2. Se mezclaron y se añadieron 50 µl a cada tubo anterior. Se incubó en el termociclador según el siguiente protocolo: 16°C 60 min; 65 °C 10 min; 4 °C 2 min.

14.3.4. Síntesis ARNc

1. Se mezcló en un tubo eppendorf a temperatura ambiente (multiplicando las cantidades por el número de muestras a procesar): IVT Buffer Mix 24 µl y IVT Enzyme 6 µl.
2. Se mezcló y se transfirieron 30 µl a la muestra resultante del paso anterior. Se mezcló y se dio un breve spin e incubó en el termociclador según el siguiente protocolo: 40°C 16 horas; 4 °C indefinido.
3. Se procedió a la purificación de ARNc siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Ambion WT Expresión kit (Ambion, P/N 4411974)).
4. Se cuantificó el ARNc obteniendo mediante espectrofotómetro Nanodrop la cantidad de ARNc obtenida del tipo de tejido de procedencia.

14.3.5. Síntesis ADNc (2°Ciclo)

1. Se mezcló en un tubo el ARNc resultante del paso anterior con los Random Primers de la siguiente manera: ARNc 10 µg de volumen variable, Random Primers (3 µg/ µl) y agua RNase-free hasta completar 24 µl.
2. Se incubó en el termociclador según el siguiente protocolo: 70°C 16 5 min; 25 °C 5 min y 4 °C 2min.

3. Se preparó la siguiente mezcla (multiplicando las cantidades por el número de muestras a procesar): 2nd-cycle Buffer Mix 8 μ l y 2nd-cycle Enzyme 8 μ l.
4. Se añadieron 16 μ l a cada muestra y posteriormente se incubó en el termociclador según el siguiente protocolo: 25°C 10 min; 42°C 90 min; 70°C 10 min; 4 °C 2 min.

14.3.6. Hidrólisis y limpieza de ADN SS (+)

1. Se añadieron 2 μ l de RNasa H a cada muestra, y se incubó en un termociclador según el siguiente protocolo: 37°C 45 min; 95°C 5 min; 4°C menos de 2 min.
2. Se purificó el ADN siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Ambion WT Expresión kit (Ambion, P/N 4411974)).
3. Se cuantificó el ADN obteniendo mediante espectrofotómetro Nanodrop (ND 1000). Teniendo en cuenta que debe haber > 5,5 μ g de ADN SS (+) por muestra.

14.3.7. Fragmentación del ADN SS (+)

1. Se preparó en un tubo el ADN resultante del paso anterior de la siguiente manera: ADNss (+) 5,5 μ g; agua RNase-free hasta completar 31,2 μ l.
2. Se realizó la siguiente mezcla (multiplicando las cantidades por el número de muestras a procesar): agua RNase-free hasta completar 10 μ l; 10X ADNc fragmentation buffer 4,8 μ l; UDG 10U/ μ l 1 μ l; APE 1 1000 U/ μ l 1 μ l.
3. Se añadieron 16,8 μ l a cada muestra y se incubó en el termociclador según el siguiente protocolo (programa Gene 7): 37°C 60 min; 93°C 2 min; 4 °C 2 min.
4. Se mezcló, se centrifugó y se añadieron 45 μ l a un nuevo tubo de 1,5 ml. El material restante se utilizó para analizar mediante Agilent (PNT-GEN-01) la calidad de la fragmentación del ADN, que debe mostrar la mayoría de los fragmentos entre 40 y 70 pares de bases.

14.3.8. Marcaje del ADN fragmentado

1. Se mezclaron (multiplicando las cantidades por el número de muestras a procesar): 5X TdT buffer 12 μ l; TdT 20U/ μ l 2 μ l.; DNA labeling Reagent, 5mM 1 μ l.
2. Se transfirieron 15 μ l a cada muestra.
3. Se incubaron las muestras en bloques térmicos siguiendo el siguiente patrón: 37°C 60 min; 70°C; enfriando en hielo 2-10 min.

14.3.9. Hibridación del array (I)

1. Se sacaron los arrays a temperatura ambiente una hora antes de la hibridación.
2. Se mezcló en un tubo Eppendorf: ADN fragmentado marcado 27 μ l; Control oligonucleotide B2 1,7 μ l; 20X eukaryotic Hybridization controls 5 μ l; 2X Hybridization buffer 50 μ l; DMSO 7 μ l; Agua RNase-free hasta completar 100 μ l.
3. Se incubó la sonda 5 min a 99°C
4. Se incubó la sonda 5 min a 45°C
5. Se centrifugó la sonda 1min a máxima velocidad
6. Se inyectaron 130 μ l de la solución de hibridación en el array correspondiente.
7. Se matuvo durante 17-18 horas a 60 rpm a 45°C en el horno de hibridación affymetrix.

14.3.10. Hibridación del array (II)

1. Una vez transcurridas las 17-18 horas de hibridación, se retiró la solución de hibridación de los arrays y se guardó a -80°C. Se pinchó el array con 100 μ l de Wash A (Gene chip hybridization, wash and satín kit P/N 900720).
2. Se colocaron los arrays y las soluciones de tinción (Gene chip hybridization, wash and satín kit P/N 900720) en la Fluidics station y se desarrolló protocolo de lavado adecuado según el tipo de array y según las especificaciones de la casa comercial (www.affymetrix.com)

3. Una vez finalizado el lavado se escanearon los arrays utilizando el GenChip Scanner 3000.

14.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS:

Los valores de expresión absolutos para cada sonda se calcularon mediante el software MAS 5.0. En todos los casos se cumplían los criterios de una hibridación de buena calidad: Scaling factor (SF) menor de tres, es decir, el SF más elevado no superaba en 3 veces al más bajo; proporción entre la señal del extremo 3' de GAPDH y el extremo 5' inferior a 2,5; y número de sondas presentes en el chip superior al 40%.

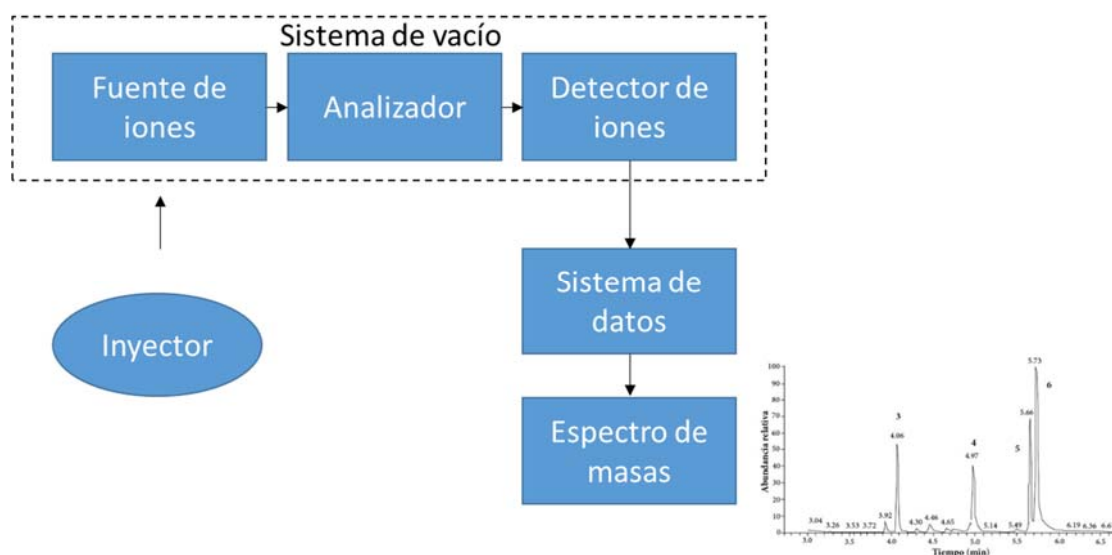
Los análisis comparativos se realizaron mediante el algoritmo SAM (Significance analysis microarray) versión 4.01. Los genes desregulados con un Q valor <0.05 se consideraron significativos.

15. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC/MS)

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) es una técnica analítica que combina el poder de separación del HPLC con la selectividad, sensibilidad y precisión en la determinación de la masa molecular de la espectrometría de masas, proporcionando información cualitativa y cuantitativa de la composición de una muestra. Los componentes de la muestra separados en el HPLC pasan al espectrómetro de masas a través de una interfaz donde son ionizados. El equipo de LC-MS presenta una interfase de ionización a presión atmosférica (API), denominada electrospray (ESI). Los iones generados en la interfase son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga (m/z) determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador (Figura 21).

El registro obtenido se denomina espectro de masas y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados.

Figura 21. Diagrama de trabajo de un espectrómetro de masas



Mediante esta técnica, se evaluó la presencia o ausencia de filanesib en el medio de cultivo RPMI1460, previamente co-cultivado con la proteína AAG.

La evaluación de las muestras y la interpretación de los resultados se llevó a cabo por el personal cualificado del Servicio de Análisis Elemental, Cromatografía y Masas de la Universidad de Salamanca (integrado en el Servicio NUCLEUS de Apoyo a la Investigación).

Equipo y reactivos

1. Dilución patrón de filanesib 10 nM en medio de cultivo RPMI1460.
2. AAG 1.2 g/L en medio de cultivo RPMI1460 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

3. Filtros Microcon-10kDa Centrifugal Filter (Merck KGaA, Darmstadt Germany), que retienen proteínas de peso molecular similar a la AAG o inferior.
4. Equipo HPLC Alliance 2795, equipado con un detector de espectrometría de masas de cuadrupolo waters ZQ4000 (Waters Corporation, Milford, MA, USA).
5. Columna KinetexXB-C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

Procedimiento

1. Se añadió filanesib a una concentración final de 10 nM en un pocillo con medio de cultivo con 0 g/L de AAG y un pocillo con medio de cultivo con 1,2 g/L de AAG. Se homogenizaron las muestras.
2. Se dejó incubando durante 48 horas en atmósfera húmeda, 5% CO₂ y 95% de aire.
3. Se filtraron las muestras con filtros microcon 10kDa para retirar la proteína AAG del medio, siguiendo las indicaciones del fabricante.
4. Se analizaron las muestras en el equipo HPLC Alliance 2795, equipado con un detector de espectrometría de masas de cuadrupolo waters ZQ4000.
 - 4.1. Para la cromatografía se emplearon las siguientes condiciones:
 - 4.2. Columna KinetexXB-C18 de 100 mm de largo y 2,1 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 2.1 micras y un tamaño de poro de 100 Å.

Disolventes:

A: agua con 0,1% de ácido fórmico.

B: Acetonitrilo.

Programa:

| Tiempo (min) | %A | %B | Flujo (ml/min) |
|--------------|----|----|----------------|
| 0 | 95 | 5 | 0,2 |
| 20 | 50 | 50 | 0,2 |

| | | | |
|----|---|-----|-----|
| 21 | 0 | 100 | 0,2 |
| 25 | 0 | 100 | 0,2 |

Para la identificación de la molécula de filanesib se utilizó la muestra patrón y se siguieron sus señales de unidad de masa atómica (uma) de 146 y 421 uma obtenidas por electrospray positivo.

RESULTADOS

CAPÍTULO I. EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA EFICACIA Y MECANISMO DE ACCIÓN DE FILANESIB EN MIELOMA MÚLTIPLE

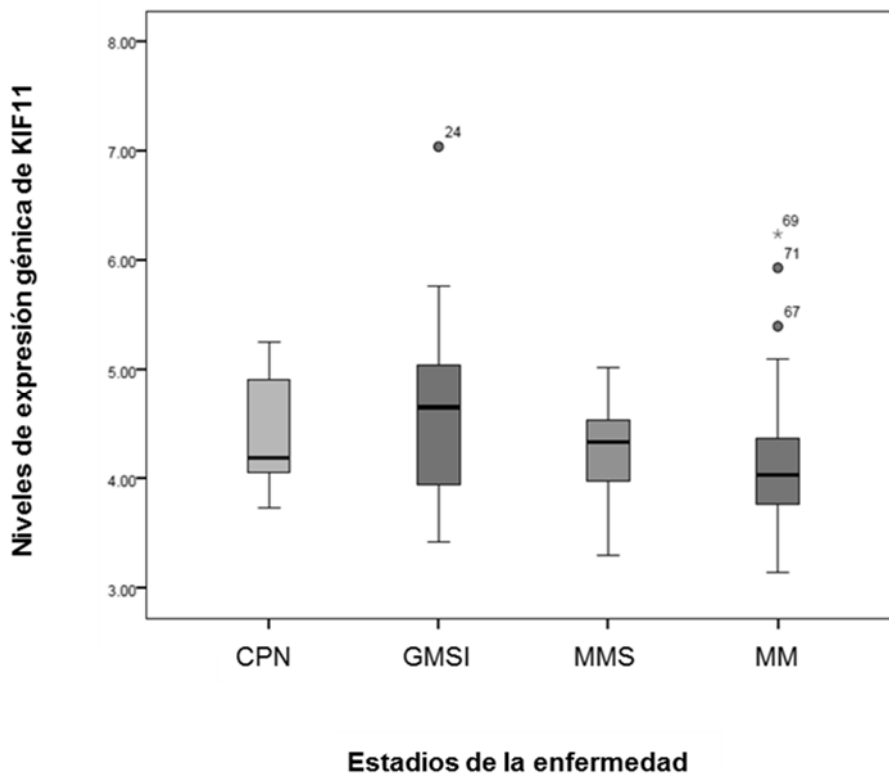
Como se ha comentado en la introducción, filanesib es un fármaco inhibidor de la proteína KSP (también denominada KIF11 o Eg5), que se ha evaluado en varias enfermedades neoplásicas y que ha resultado ser eficaz en pacientes con MM muy tratados con un perfil de toxicidad reversible y manejable. Además, se ha identificado que filanesib disminuye los niveles de la proteína antiapoptótica Mcl-1 (miembro de la familia Bcl-2), esencial para la supervivencia del MM, y que la disminución de los niveles de esta proteína es clave para desencadenar la muerte celular con este fármaco. Basado en estos datos, en este capítulo se evaluó, en primer lugar, la posible influencia de esta proteína en el pronóstico de MM. Posteriormente, se estudió la eficacia preclínica de filanesib *in vitro* e *in vivo* en el MM y se profundizó en las claves de su mecanismo de acción, en busca de biomarcadores que pudieran predecir la respuesta a este fármaco. En este sentido, se analizó la posible repercusión de los niveles de la proteína KSP y de las proteínas de la familia Bcl-2 en la eficacia anti-mieloma de filanesib. Además, se evaluó la actividad *in vitro* de filanesib en combinación con otros fármacos utilizados en la práctica clínica habitual del MM con el objetivo de identificar las combinaciones más eficaces y con mejores perspectivas para la clínica. Los datos obtenidos de filanesib en monoterapia sentarán las bases para los siguientes capítulos de la presente Tesis Doctoral.

1. ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA EXPRESIÓN DE KSP EN EL MM.

Con la utilización de filanesib se ha identificado una posible nueva diana terapéutica en MM, la proteína KSP. Por ello, en primer lugar, se evaluó la posible repercusión que podrían tener los niveles elevados o disminuidos de esta proteína en el pronóstico del MM. Así, inicialmente, se analizó si existían diferencias en los niveles de expresión de KIF11 (el gen que codifica a la KSP) entre los diferentes estadios de desarrollo de la enfermedad y en individuos

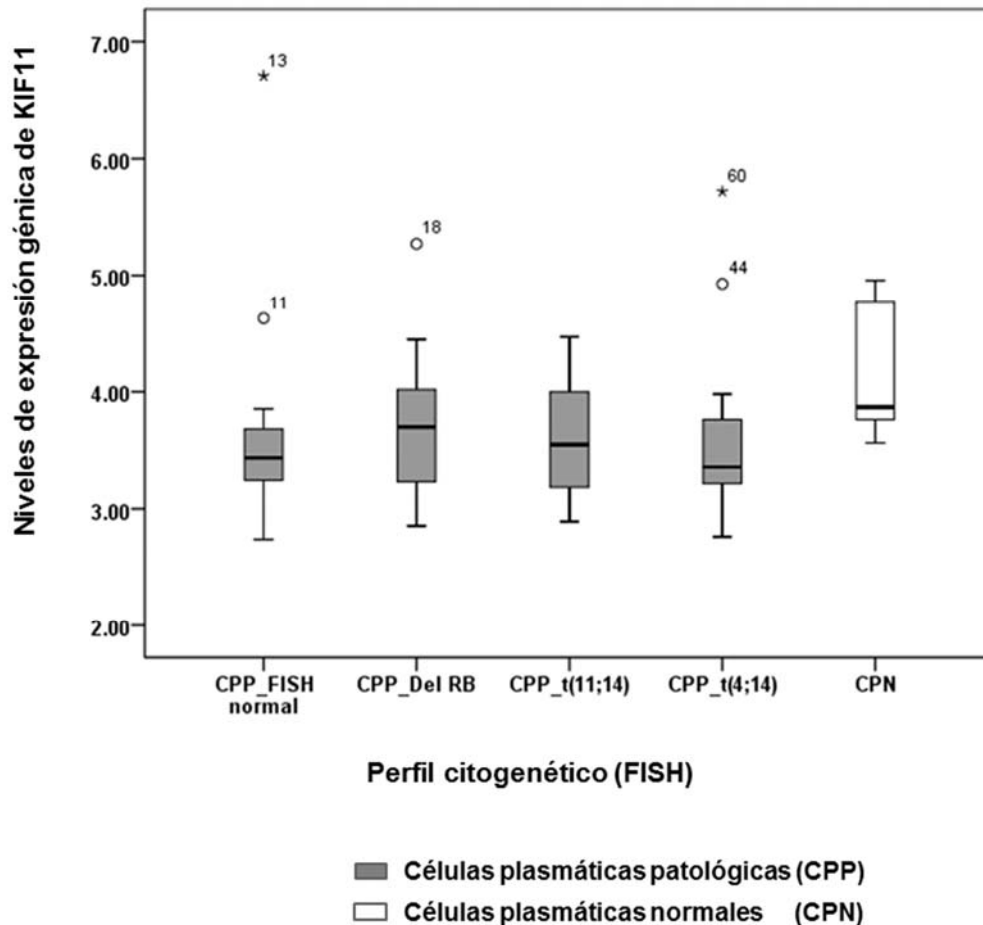
sanos. Se analizaron 99 muestras diferentes distribuidas como sigue: 5 de células plasmáticas normales (CPN) procedentes de donantes sanos, 20 de células plasmáticas procedentes de pacientes con gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), 33 con mieloma quiescente o *smoldering* (MMS) y 41 con MM sintomático (MM). Estas muestras fueron analizadas por microarrays de ARN (Human gene 1.0st array) y utilizando la base de datos GEO (número GSE47552) ¹⁹ (Figura 1.1). Se observó que el grado de expresión de KIF11 era variable en cada grupo, con varios outliers de sobreexpresión en pacientes con GMSI y sobre todo en pacientes con MM, pero no existía correlación entre la expresión de KIF11 y la evolución de la enfermedad. Por último, a pesar de que las células plasmáticas mielomatosas tendían a expresar menos KSP que las células plasmáticas de individuos sanos, estas diferencias tampoco fueron significativas (Kruskal-Wallis Test; $p=0.064$).

Figura 1.1 Análisis de la expresión génica de KIF11 en los diferentes estadios del MM (GMSI, MMS y MM) y su comparación con células plasmáticas normales (CPN).



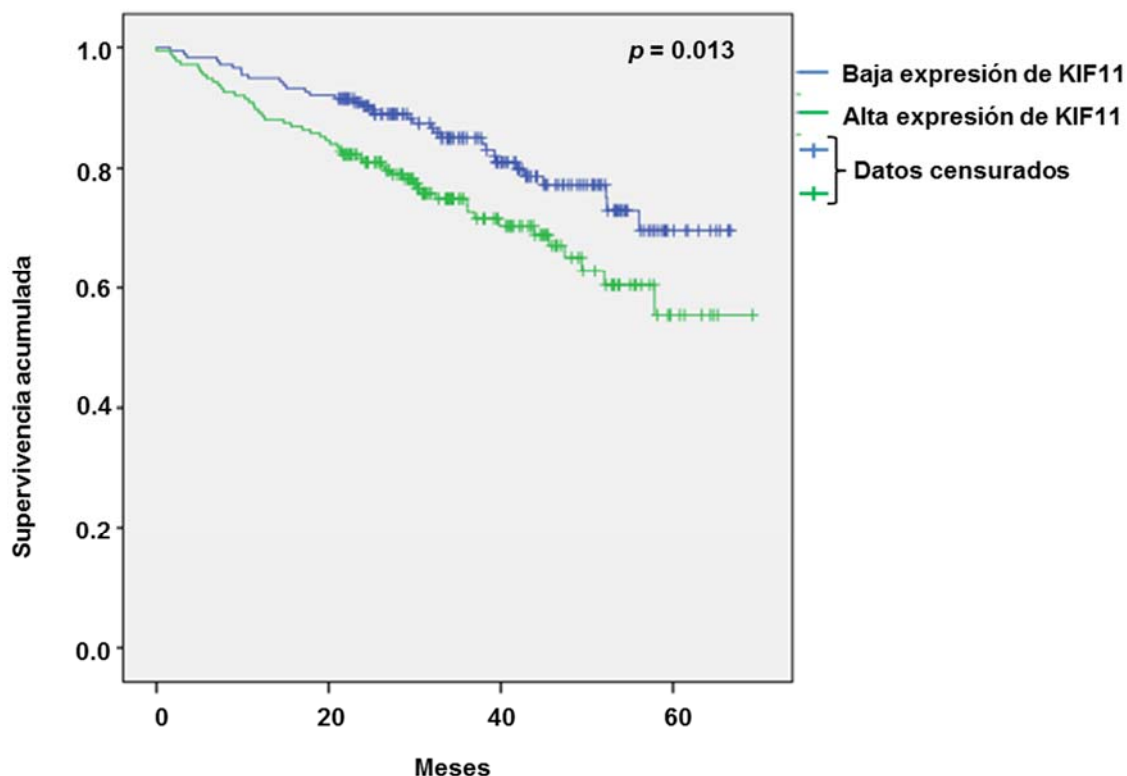
En un segundo momento, se investigó la posible relación de la expresión del gen de la KSP con las translocaciones asociadas a mal pronóstico en MM. Para ello, se analizó la expresión del gen KIF11 en células plasmáticas patológicas de pacientes con MM sintomático con diferentes perfiles citogenéticos y en células plasmáticas de individuos sanos por microarray de ARN (Human gene 1.0 st array) y utilizando la base de datos de GEO (número GSE16558) ²⁸. Se evaluaron 65 muestras de distintos individuos: 5 controles sanos con células plasmáticas normales (CPN); 13 pacientes con células plasmáticas patológicas (CPP) con FISH normal; 15 con CPP con el gen RB deletado (CPP Del RB); 15 con CPP con translocación (11;14) (CPP t(11;14)) y 17 con CPP con translocación (4;14) (CPP t(4;14)). Se observó que la expresión de ARN de KIF11 era variable dentro de cada grupo con una tendencia a ser mayor en células plasmáticas sanas y con varios outliers de sobreexpresión del gen en pacientes con mieloma pero que no presentaba diferencias significativas entre los diferentes grupos (Kruskal-Wallis Test; $p=0.275$). En definitiva, no había ninguna correlación entre la expresión de KSP y la presencia o ausencia de translocaciones asociadas a un mal pronóstico, además, aunque las células plasmáticas mielomatosas tenían menor expresión génica de KSP que las células plasmáticas normales, tampoco se demostró una correlación significativa (Figura 1.2).

Figura 1.2 Análisis de la expresión de KIF11 por arrays de RNA en células plasmáticas normales y en células plasmáticas de pacientes con MM con diferentes perfiles citogenéticos analizadas por FISH.



Por último, se analizó si existía correlación entre los niveles de expresión génica de KIF11 y la supervivencia de pacientes con MM. Para ello se seleccionó la base de datos de GEO número GSE2658 ^{25, 188-190} que cuenta con un gran número de muestras de pacientes N=351 homogéneamente tratados (según el protocolo Terapia Total 2, TT2) y que dispone de datos de supervivencia. Las muestras de esta base de datos fueron analizadas por microarray de ARN (Human Genome U133 Plus 2.0). Se analizaron un total de 351 pacientes con MM que se dividieron en dos grupos en función de la expresión del gen, la expresión alta se consideró por encima del valor del percentil 50 y la expresión baja por debajo de este valor. Se observó que, dentro de los pacientes, la mayor expresión de KIF11 se asoció de manera significativa a una menor supervivencia global (Log Rank test p=0.013) (Figura 1.3).

Figura 1.3 Análisis de la supervivencia de pacientes con MM (n=351) según la expresión génica de KIF11 (Eg5 o KSP).

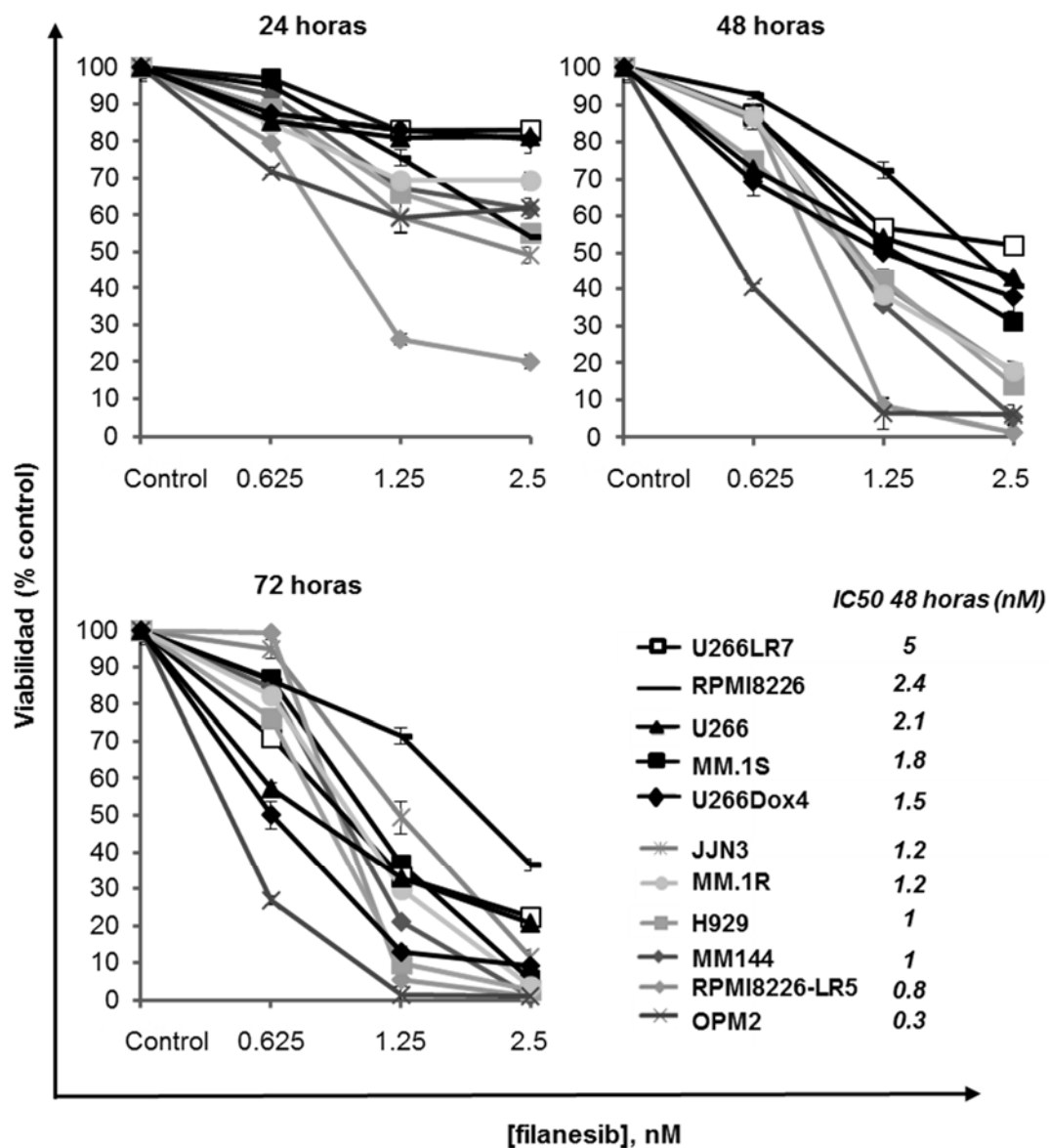


2. ANÁLISIS DEL EFECTO DE FILANESIB SOBRE LÍNEAS CELULARES DE MM.

Con el fin de evaluar el potencial papel de filanesib en el tratamiento del MM, en primer lugar, se analizó la actividad citotóxica *in vitro* de filanesib sobre las células de MM. Para ello, se trataron once líneas celulares de MM con diferentes perfiles citogenéticos y de resistencia a fármacos (Tabla 5 material y métodos) con concentraciones y tiempos crecientes y se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT (Figura 1. 4). Se observó que todas las líneas celulares respondían a filanesib y que esta respuesta era mayor a medida que aumentaba la concentración y el tiempo de exposición del fármaco. A 48 horas la eficacia anti mieloma era mayor que a 24 horas y similar a la de 72 horas, por lo que se utilizó ese tiempo (48 horas) como referencia para los siguientes experimentos. Tras este periodo, aunque todas las líneas celulares fueron sensibles a filanesib, se observó que se dividían en dos grupos: aquellas que

son más sensibles, sin apenas células viables a 2.5nM (OPM-2, RPMI-8226-LR5, MM144, H929, MM.1R y JJN3) y aquellas que son menos sensibles, con un 30-50% de viabilidad a 2.5 nM y con IC₅₀ mayores (U266Dox4, MM.1S, U266, RPMI8226 y U266LR7). Se observó además que líneas celulares (como OPM-2 o RPMI8226-LR5) que son más resistentes a fármacos utilizados en la clínica habitual del MM fueron muy sensibles a filanesib. En la figura se indican los valores IC₅₀ para cada línea celular y para cada tiempo calculados mediante regresión no lineal utilizando el programa Sigma Plot 6.0. Como las líneas celulares evaluadas presentaron diferentes patrones de sensibilidad, a lo largo de este capítulo se trató de profundizar en los motivos que podrían ser responsables de estas diferencias.

Figura 1.4. Eficacia de filanesib en diferentes líneas celulares de MM a dosis y tiempos crecientes de tratamiento y valores del IC₅₀ a 48 horas para cada línea empleada. Gráficos representativos de dos experimentos independientes.



La rapidez de acción de un fármaco es un dato relevante desde el punto de vista clínico. Para evaluarlo preclínicamente, se estudió el tiempo mínimo de exposición a filanesib que es suficiente para desencadenar la muerte. Para ello se realizaron experimentos de lavado y medida de la viabilidad por ensayos de MTT y Anexina V, utilizando la línea celular MM.1S, representativa de la

enfermedad. Estas células se expusieron a una dosis relevante de filanesib 10 nM, que no supera a la concentración plasmática alcanzada en clínica, a tiempos crecientes (desde 0 hasta 48 horas) y luego se lavaron con medio de cultivo (mediante dos centrifugaciones sucesivas y absorción del sobrenadante) para eliminar el fármaco, y se mantuvieron en cultivo hasta 48 horas. Transcurrido este tiempo se evaluó la viabilidad celular por MTT (Figura 1.5). Se observó que, con 1 hora de exposición, filanesib ejercía todo su efecto citotóxico; la viabilidad tras 1 hora de tratamiento era similar a la de 48 horas de exposición. Se probó un tiempo inferior de exposición, 15 minutos, y tras retirar el fármaco del cultivo se evaluó la viabilidad por Anexina V (Figura 1.6). Se encontró que 15 minutos de exposición a filanesib fueron suficientes para que este realizara todo su efecto, con una disminución de la viabilidad celular (Anexina V (-) /Ioduro de propidio (-)) similar a la de las células mantenidas con el fármaco durante las 48 horas.

Figura 1.5 Estudio del tiempo mínimo de exposición de MM.1S a filanesib 10 nM (1, 3, 6, 12, 24, 48 horas y posterior lavado) para ejercer su efecto citotóxico en un cultivo de 48 horas. Gráfico representativo de dos experimentos independientes.

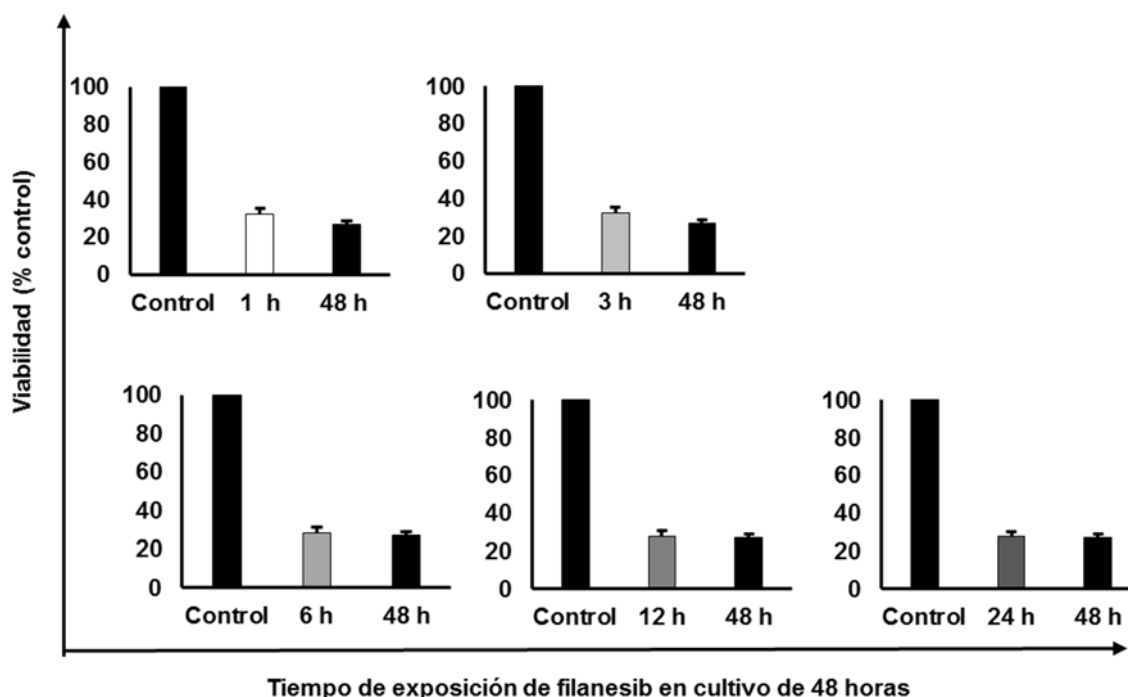
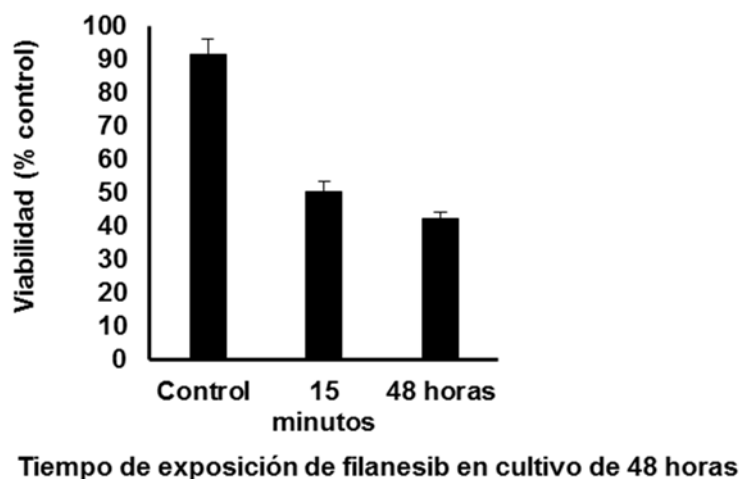


Figura 1.6 Estudio de la eficacia de un tratamiento de 15 minutos con filanesib 10 nM en un cultivo de 48 horas de la línea celular MM.1S. Gráfico representativo de dos experimentos independientes.



3. ANÁLISIS DE LA EFICACIA ANTI-MIELOMA DE FILANESIB EN PRESENCIA DE CITOQUINAS Y CÉLULAS PROPIAS DEL MICROAMBIENTE DEL MM.

Para evaluar si filanesib era capaz de vencer la resistencia proliferativa de las células de mieloma en presencia de algunos componentes presentes en el microambiente medular se utilizaron dos modelos experimentales. En primer lugar, se incubaron células MM.1S durante 48 horas con IL-6 (1 nM) o IGF1 (10 nM) y dosis crecientes de fármaco y se evaluó la viabilidad celular por la técnica MTT. Se observó, como muestran las condiciones del control, que la adición exógena de estos dos factores provocaba un aumento en la viabilidad de en torno a un 40% en MM.1S. A pesar de esta ventaja proliferativa conferida por estos factores, filanesib continuó siendo eficaz en esta situación (Figura 1.8). En segundo lugar, se investigó la eficacia anti-mieloma de filanesib en un co-cultivo de células MM.1S-luc con células mesenquimales estromales derivadas de pacientes con MM (pBMSC) y de una línea celular estromal (hMSC-TERT) (Figura 1.9) y se cuantificó la viabilidad celular por bioluminiscencia. Se confirmó que las células mesenquimales estromales conferían un efecto protector en las

células de mieloma, con un aumento en la viabilidad de las células control MM.1S-luc co-cultivadas del 40-80%. Además, se observó que filanesib venció este efecto protector siendo eficaz y de forma dependiente a la dosis. Estos datos demuestran que filanesib es capaz de vencer la ventaja protectora y proliferativa conferida por factores presentes en el microambiente medular.

Figura 1.8 Eficacia de filanesib en células MM.1S en presencia de IGF1 o IL6 a 48 horas. Gráficos representativos de dos experimentos independientes.

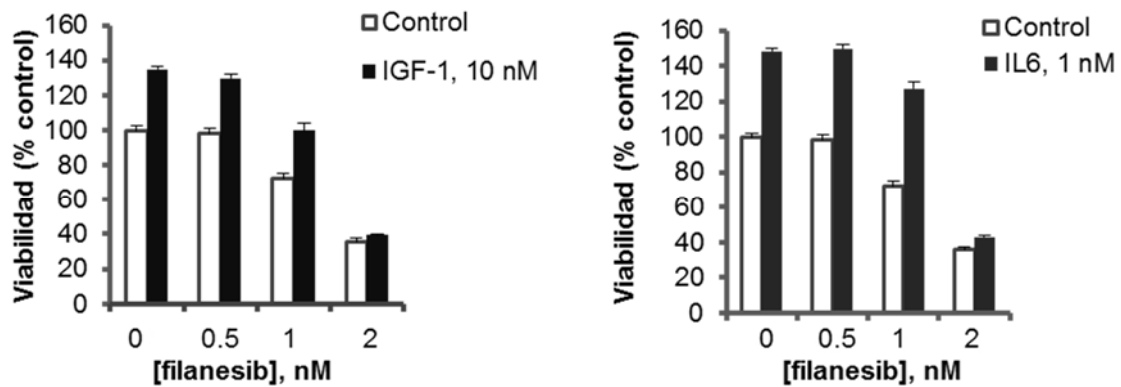
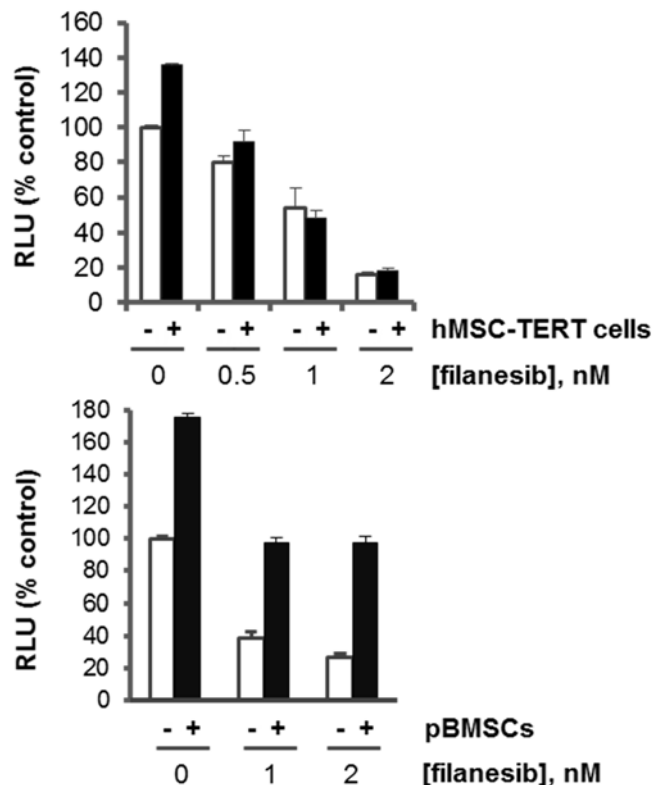


Figura 1.9 Eficacia de filanesib en MM.1S-luc en co-cultivo con hMSC-TERTy pBMSCs *Viabilidad celular medida por RLU (unidades de

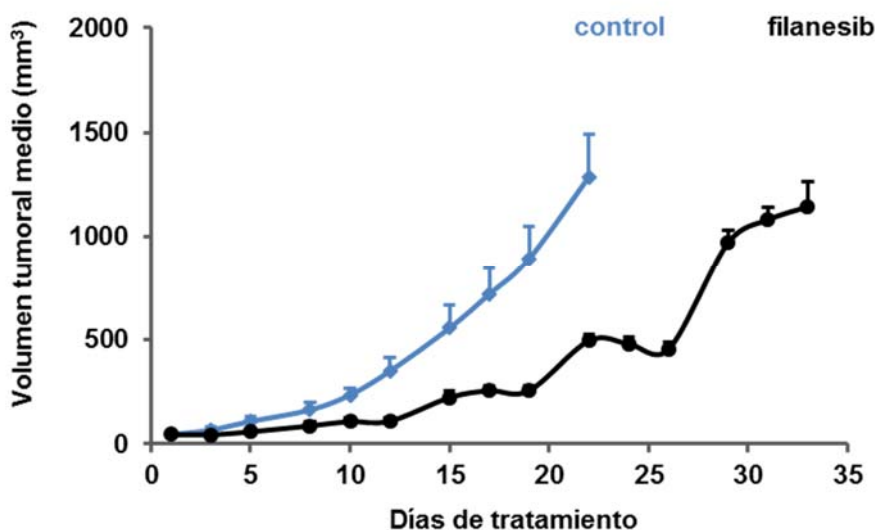


luminiscencia relativa) a 48 horas. Gráficos representativos de dos experimentos independientes.

4. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA *IN VIVO* DE FILANESIB EN UN MODELO MURINO DE PLASMOCITOMA HUMANO.

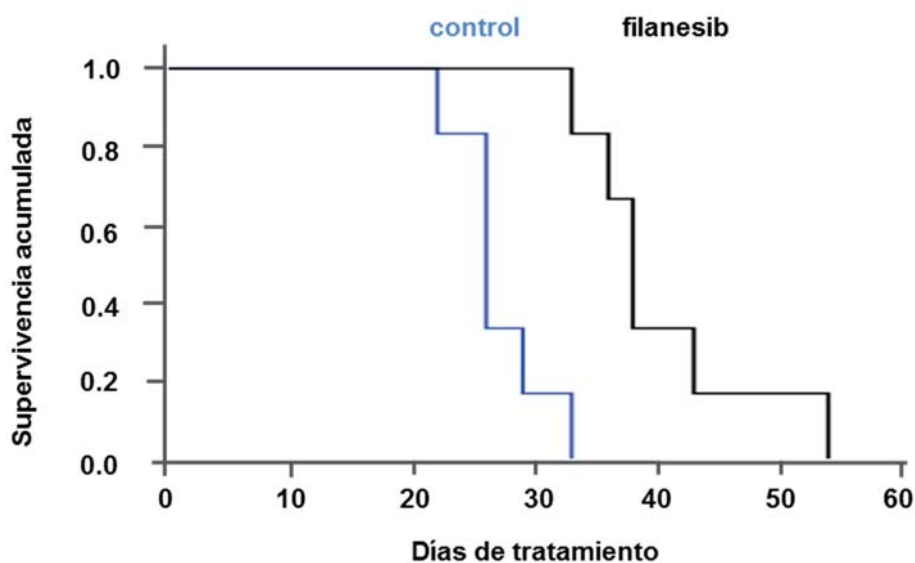
El efecto *in vivo* de filanesib se estudió utilizando un modelo de xenoinjerto de células de mieloma humano en ratones CB17-SCID. Se utilizó la línea celular MM.1S para producir un plasmocitoma subcutáneo en el ratón. Una vez que los ratones desarrollaron los tumores, estos se dividieron, de manera aleatoria, en dos grupos: control y grupo de tratamiento (n =6 ratones por grupo). A los ratones tratados se les administró filanesib a una dosis de 10 mg/Kg por vía intraperitoneal durante dos días consecutivos cada semana, mientras que al grupo control se le administró el vehículo usado para diluir el fármaco, PBS al 10% de DMSO. En la Figura 1.10 se representa la evolución del tamaño medio del tumor en los diferentes grupos en función del tiempo. El tratamiento con filanesib retrasó el crecimiento del tumor con respecto al grupo control y con diferencias que fueron significativas ($p < 0.05$) desde el día 10 tras el inicio del tratamiento.

Figura 1.10 Evolución del volumen tumoral de ratones control frente a los tratados con filanesib.



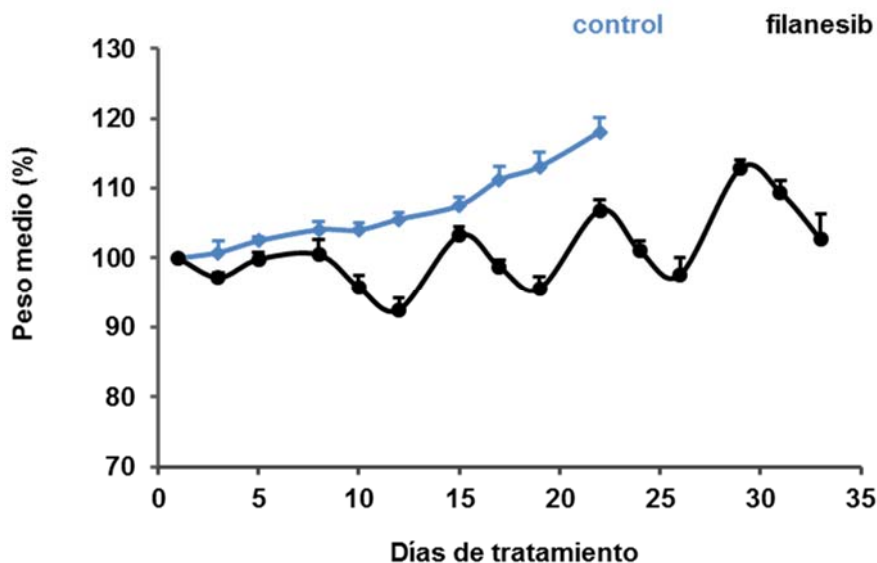
Además, el análisis de la supervivencia global de los animales mediante curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Figura 1.11) demostró diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control, con una mediana de supervivencia de 26 días (rango 22 - 33) para los ratones control frente a 38 días (rango 33 - 54) en los ratones tratados con filanesib.

Figura 1.11 Curvas de supervivencia de ratones control frente a los tratados con filanesib (Log Rank test $p = 0.001$).



Durante todo el estudio los ratones fueron examinados para detectar posibles síntomas de toxicidad y variaciones de peso. En general, se observó un buen aspecto en los ratones pero con mayores pérdidas de peso en el grupo tratado con filanesib, sobre todo tras la administración de la droga. Sin embargo, estas pérdidas de peso no fueron superiores al 10-20% del peso corporal y el peso se recuperaba durante los días de descanso sin tratamiento (Figura 1.12).

Figura 1.12 Evolución del peso de los ratones control frente a los tratados con filanesib.



5. ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA EXPRESIÓN DE KSP EN LA RESPUESTA A FILANESIB.

Una vez demostrada la eficacia de filanesib *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, se estudió la repercusión que podía tener la proteína KSP en la respuesta a filanesib en MM. Se analizaron los niveles basales de KSP por Western blot en las 11 líneas celulares de MM previamente utilizadas para testar la eficacia de filanesib (Figura 1.13). Se observó que todas las líneas celulares de MM expresaban la proteína KSP lo que justificaría el hecho de que todas respondieran a filanesib. Además, se observó que esta expresión era variable. Se estudió si existía correlación entre la expresión de KSP y la mayor o menor sensibilidad a filanesib a 48 horas; definida previamente en el apartado 2 del presente capítulo. Se observó que las células más sensibles a filanesib tendían a expresar más KSP, que las células menos sensibles (Figura 1.14). De hecho, RPMI-8226-LR5 (una de las líneas más sensibles a filanesib) era la que más KSP expresaba y U266 la que menos (una de las líneas menos sensibles a filanesib). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($p \geq 0.05$).

Figura 1.13 Análisis de los niveles basales de la proteína KSP en líneas celulares de MM. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

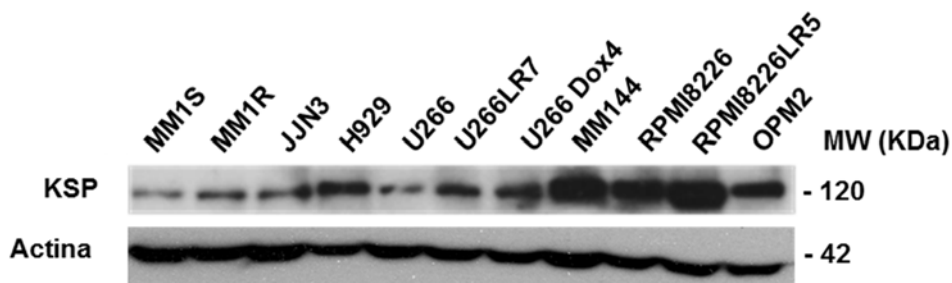
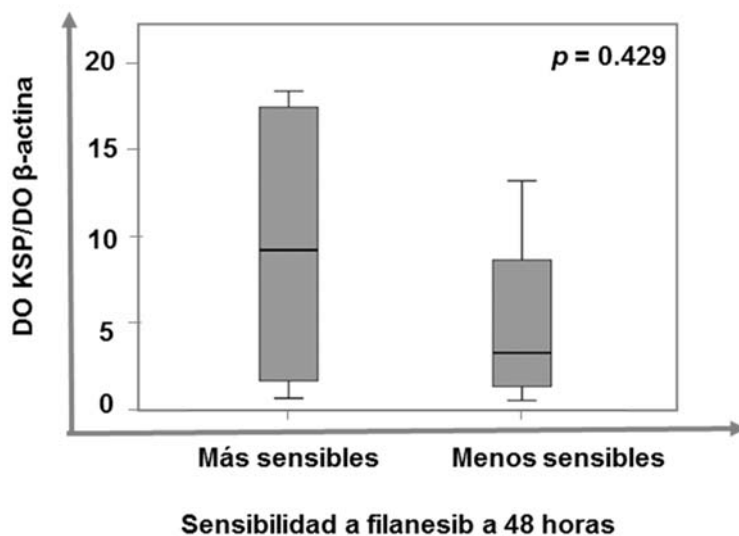


Figura 1.14 Diagrama de cajas de la sensibilidad a filanesib y su relación con los niveles basales de la proteína KSP en líneas celulares de MM, realizado a partir de la cuantificación de las bandas obtenidas en el experimento anterior.



Dado que el grado expresión de la diana de filanesib no explicaba completamente las diferencias en la respuesta al fármaco, se estudió el mecanismo de acción de este fármaco en profundidad con el fin de evaluar otras posibles causas responsables de estas diferencias.

6. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE FILANESIB PARA INHIBIR KSP EN CÉLULAS DE MM.

Con el fin de comprobar el mecanismo de acción específico de filanesib se analizó la capacidad de inhibición de la diana de filanesib, la proteína KSP, clave en la separación de los centrosomas para formar del huso mitótico bipolar. Para ello se estudió el fenotipo de los husos mitóticos de la línea celular MM.1S en metafase por microscopía confocal con un doble marcaje con DAPI (azul) y α -tubulina (verde) a 24 horas, un tiempo en el que el fármaco aún no muestra una actividad citotóxica importante (Figura 1.15). Se observó que las células control que no recibieron el tratamiento con filanesib, tan solo el vehículo, presentaron metafases con husos bipolares normales: con los centrosomas correctamente separados a ambos polos de la célula, los microtúbulos (en verde) en forma de huso y los cromosomas (en azul) alineados en la placa metafásica. La inhibición de las KSP tras el tratamiento con filanesib durante 24 horas bloqueó a las células en metafase, induciendo la aparición de husos mitóticos monopolares en los que los centrosomas estaban juntos, dispuestos en el centro de la célula, los microtúbulos se irradiaban desde el centro de la célula al exterior simulando una rueda de carro y los cromosomas se orientaban sintéticamente (Figura 1.15 y Figura 1.16). Para confirmar que efectivamente filanesib inhibe a KSP y promueve la aparición de husos monopolares, se cuantificó con el microscopio de fluorescencia el número de células en metafase por campo y se analizó el fenotipo de las mismas, si era bipolar o monopolar (Figura 1.17). Se observó que las células tratadas con filanesib presentaban significativamente más células en metafase que las células control y que todas ellas eran aberrantes, con husos monopolares.

Figura 1.15 Ensayo inmunocitoquímico con marcaje de ADN (DAPI= azul) y de α -tubulina (anti-tubulina=verde) y para estudiar células en metafase tras 24 horas de tratamiento con filanesib 10 nM en MM.1S. Barra = 5 μ m en ambas micrografías. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

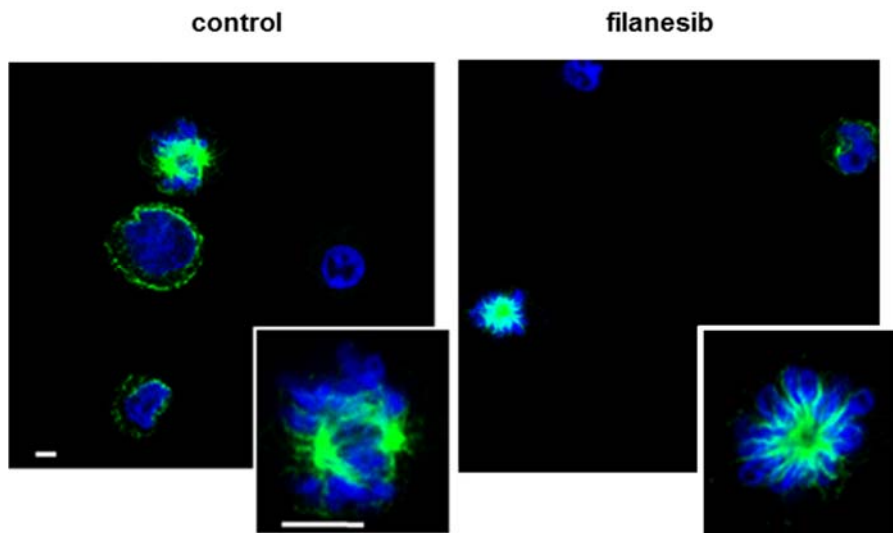


Figura 1.16 Imágenes bidimensionales en serie tomadas por microscopía confocal de una célula en metafase con huso monopolar tras 24 horas de tratamiento con filanesib 10 nM en MM.1S.

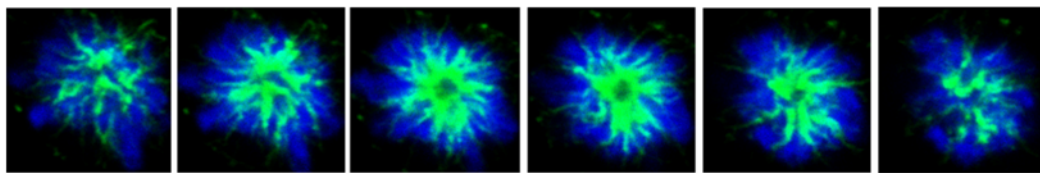
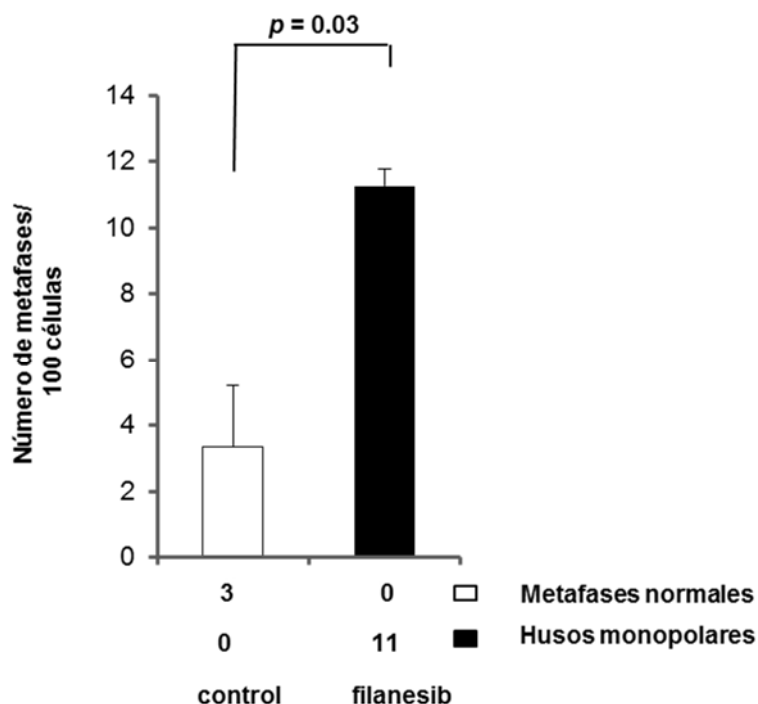


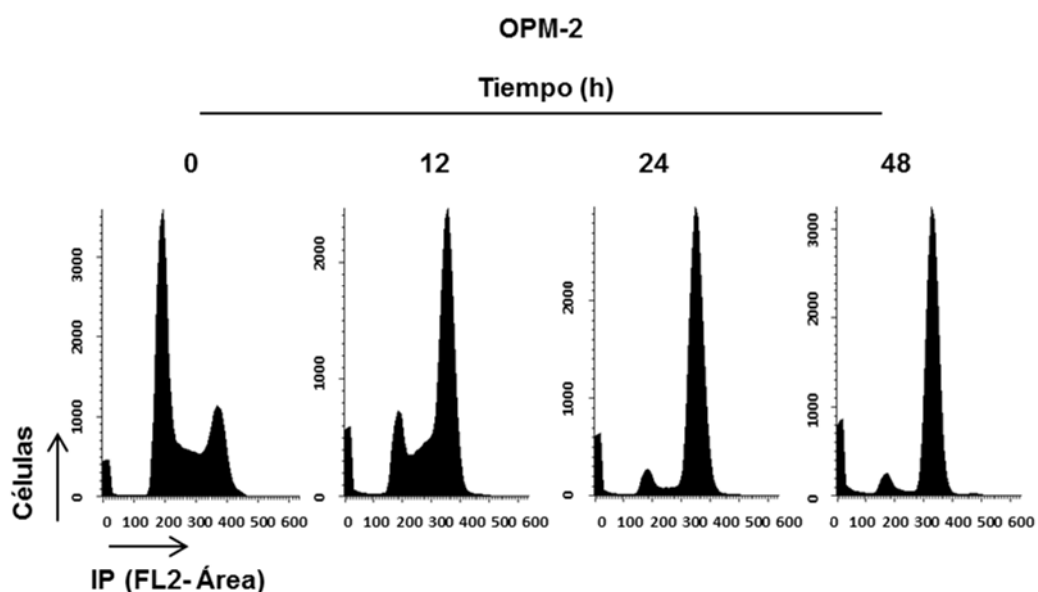
Figura 1.17 Cuantificación de la inducción de husos monopoles tras 24 horas de tratamiento con filanesib 10 nM en MM.1S (test de t de Student para dos experimentos independientes; $p=0.03$).



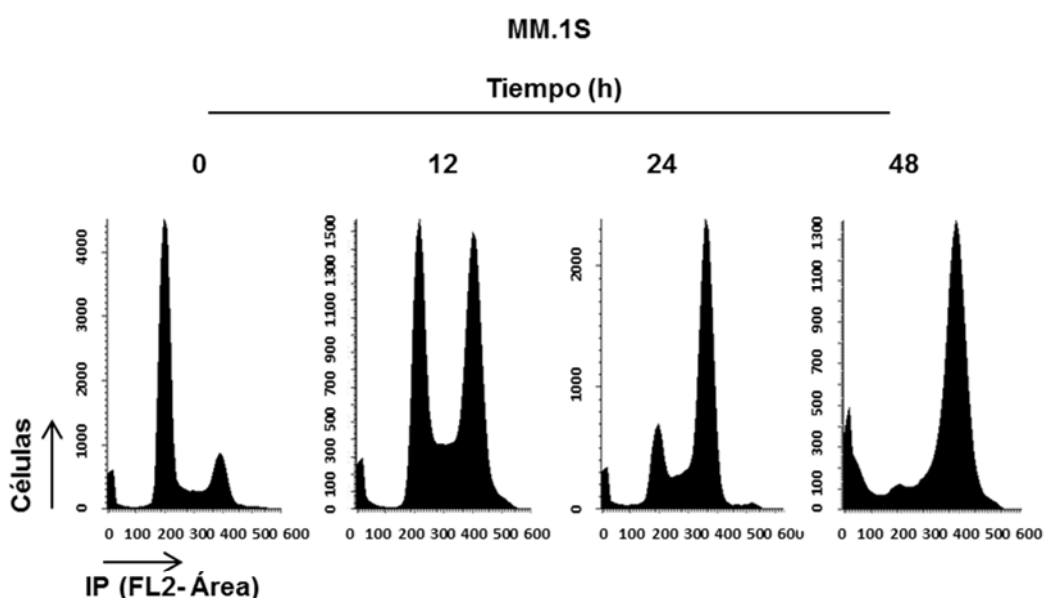
7. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE FILANESIB SOBRE EL CICLO CELULAR Y LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS.

Una vez demostrada la inhibición de KSP inducida por filanesib, se evaluaron los efectos que este evento podía provocar en las células de MM. Por ello, se analizó el perfil de ciclo celular y la inducción de la apoptosis en dos líneas celulares con diferente perfil de sensibilidad a filanesib: OPM-2 (más sensible) y MM.1S (menos sensible). El tratamiento con filanesib provocó un aumento del número de células en fase G₂/M, siendo éste un evento temprano, que se detectó desde las 12 horas de tratamiento y que fue dependiente del tiempo, alcanzando un máximo a las 48 horas. A su vez, se detectó un aumento del número de células en SubG₀, pico apoptótico, que fue más llamativa en la línea celular más sensible a filanesib OPM-2 y que además aumentaba con el tiempo de tratamiento (Figura 1.18).

Figura 1.18 Análisis del ciclo celular tras tratamiento con filanesib a 10 nM en tiempos crecientes.



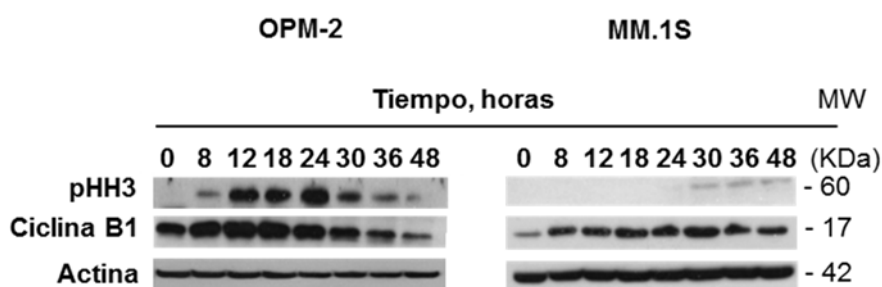
| Tiempo (horas) | 0 | 12 | 24 | 48 |
|--------------------------------|------|------|------|------|
| G ₀ /G ₁ | 53.0 | 15.9 | 7.1 | 6.7 |
| S | 14.4 | 11.2 | 2.7 | 1.8 |
| G ₂ /M | 24.4 | 58.1 | 72.6 | 66.6 |
| Pico apoptótico | 8.3 | 14.9 | 17.6 | 24.9 |



| Tiempo (horas) | 0 | 12 | 24 | 48 |
|--------------------------------|------|------|------|------|
| G ₀ /G ₁ | 72.9 | 34.0 | 21.2 | 7.3 |
| S | 8.0 | 12.8 | 12.4 | 7.4 |
| G ₂ /M | 16.6 | 51.7 | 63.3 | 70.4 |
| Pico apoptótico | 2.6 | 1.6 | 3.0 | 14.9 |

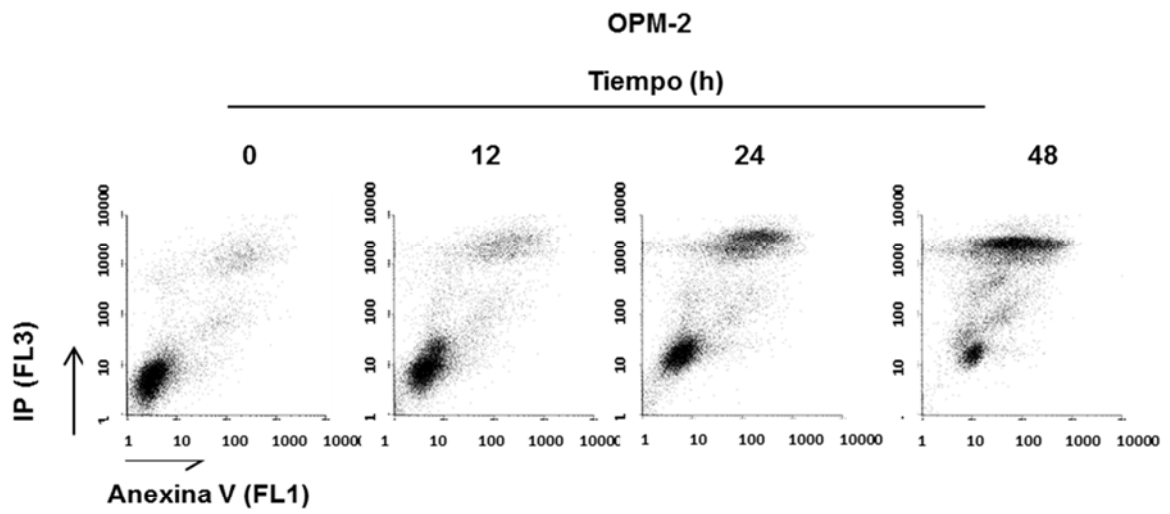
El aumento de células en G₂/M, se correlacionó con unos cambios proteicos que se demostraron por Western blot (Figura 1.19). Se observó por aumento de ciclina B1, lo que indica un incremento de células en G₂/M, y más concretamente en mitosis, por aumento de pHH3. Ambos eventos fueron dependientes del tiempo de tratamiento y mucho más tempranos y llamativos en la línea OPM-2, más sensible a filanesib.

Figura 1.19 Estudio del efecto de filanesib a 10 nM a tiempos crecientes sobre proteínas implicadas en mitosis.

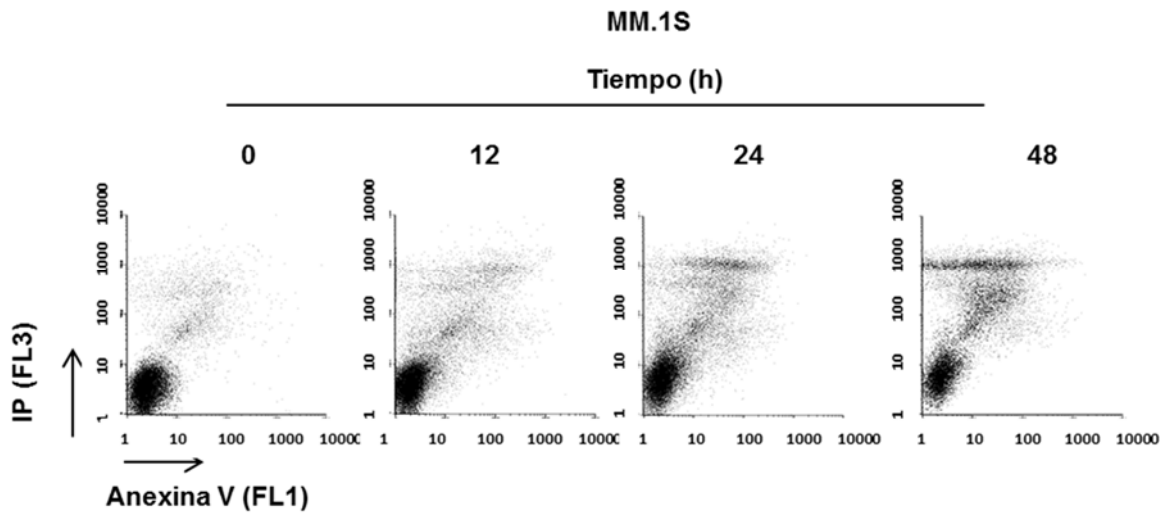


La inducción de la apoptosis detectada en el ciclo celular también se demostró por marcaje con Anexina V / Ioduro de Propidio (Figura 1.20). Nuevamente, esta apoptosis fue más llamativa en la línea celular más sensible a filanesib, OPM-2.

Figura 1.20 Análisis por citometría de flujo de la apoptosis inducida por filanesib 10nM a tiempos crecientes.



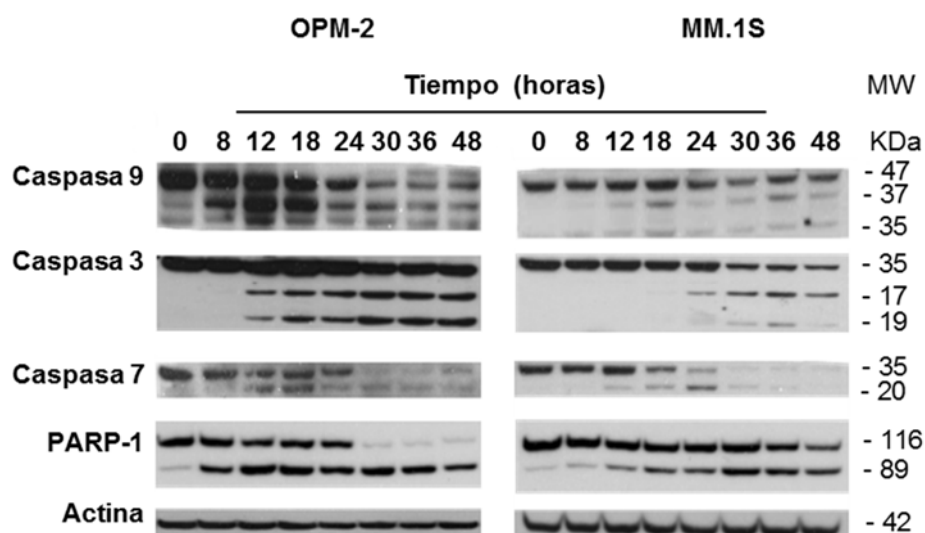
| Tiempo (horas) | 0 | 12 | 24 | 48 |
|----------------|------|------|------|------|
| AnxV(-)/IP(-) | 90.0 | 82.4 | 57.7 | 21.8 |
| AnxV(+)/IP(-) | 1.5 | 2.0 | 1.9 | 1.4 |
| AnxV(+)/IP(+) | 7.8 | 14.2 | 38.1 | 72.8 |
| AnxV(-)/IP(+) | 0.7 | 1.4 | 2.3 | 4.0 |



| Tiempo (horas) | 0 | 12 | 24 | 48 |
|----------------|------|------|------|------|
| AnxV(-)/IP(-) | 83.7 | 80.5 | 68.4 | 46.8 |
| AnxV(+)/IP(-) | 7.2 | 3.1 | 3.7 | 2.8 |
| AnxV(+)/IP(+) | 7.0 | 12.6 | 21.3 | 33.6 |
| AnxV(-)/IP(+) | 2.1 | 3.8 | 6.7 | 16.9 |

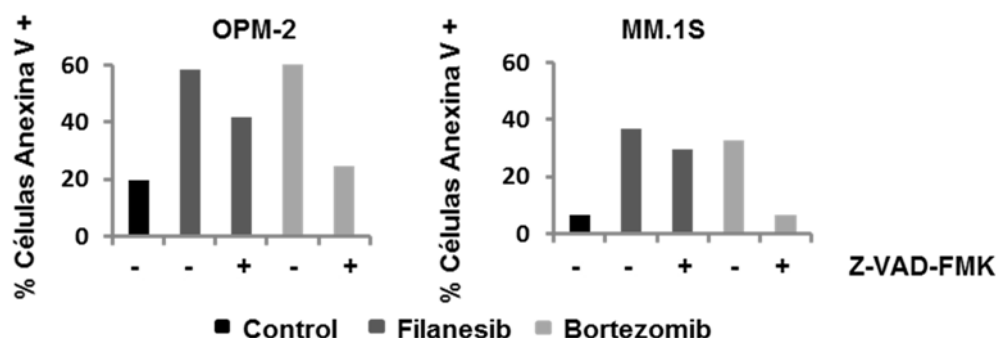
Asimismo, se analizó la implicación de las caspasas en el proceso de apoptosis mediante la técnica de Western blot (Figura 1.21). Se observó en primer lugar, el procesamiento y la consiguiente activación de la caspasa 9 iniciadora y después el de las caspasas 3 y 7 efectoras. También se observó procesamiento de PARP, uno de los sustratos de caspasa 3 y 7 implicado en fases finales de muerte celular, pero este procesamiento fue incluso previo a la activación de estas caspasas, sugiriendo que debía existir un evento proapoptótico independiente de caspasas que estaba procesando este sustrato.

Figura 1.21 Estudio del efecto de filanesib a 10 nM a tiempos crecientes sobre proteínas implicadas en apoptosis.



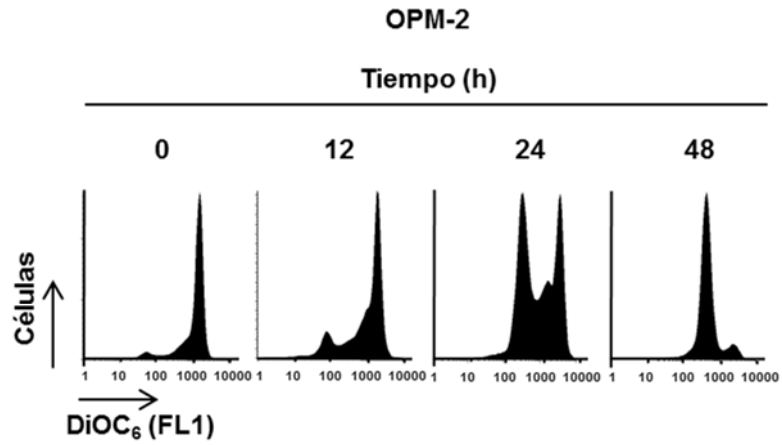
Se confirmó por pre-incubación con el inhibidor pan-caspasa Z-VAD-FMK y análisis de la citotoxicidad por citometría de flujo, que filanesib inducía apoptosis independiente de caspasas ya que la inhibición de la actividad de las caspasas con Z-VAD-FMK no fue capaz de inhibir la apoptosis, sobre todo en MM.1S (Figura 1. 22). Se utilizó el fármaco bortezomib como control positivo, ya que induce muerte dependiente de caspasas y, en este caso, la pre-incubación con Z-VAD-FMK inhibió casi totalmente la muerte celular inducida por este fármaco.

Figura 1.22 Estudio de la apoptosis por citometría de flujo en células de mieloma tras 24 horas de incubación con filanesib (10 nM) y con bortezomib (2 nM), tras un pre-tratamiento con o sin el inhibidor de pancaspasas Z-VAD-FMK (50 μ M).

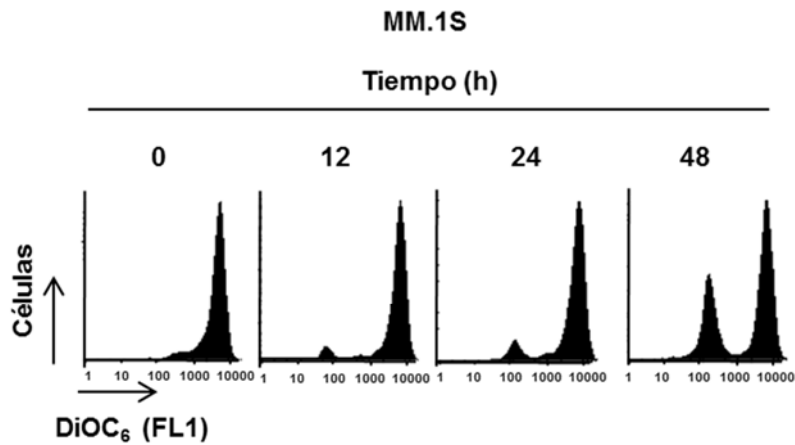


La mitocondria es un orgánulo clave en el proceso de apoptosis y su espacio intermembrana contiene proteínas que actúan como mediadoras de la respuesta apoptótica y que pueden ser liberadas al espacio citosólico como respuesta a ciertos estímulos que alteran la integridad de la membrana mitocondrial externa. Basado en esto, se estudió la integridad y el potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo y con marcaje con DiOC6 y Ioduro de Propidio tras el tratamiento con filanesib. Se observó una disminución en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), mucho más llamativa en la línea más sensible OPM-2 (Figura 1.23), lo que indica una activación de la vía mitocondrial de la apoptosis inducida por filanesib.

Figura 1.23 Evaluación de cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) tras tratamiento con filanesib 10 nM a tiempos crecientes.



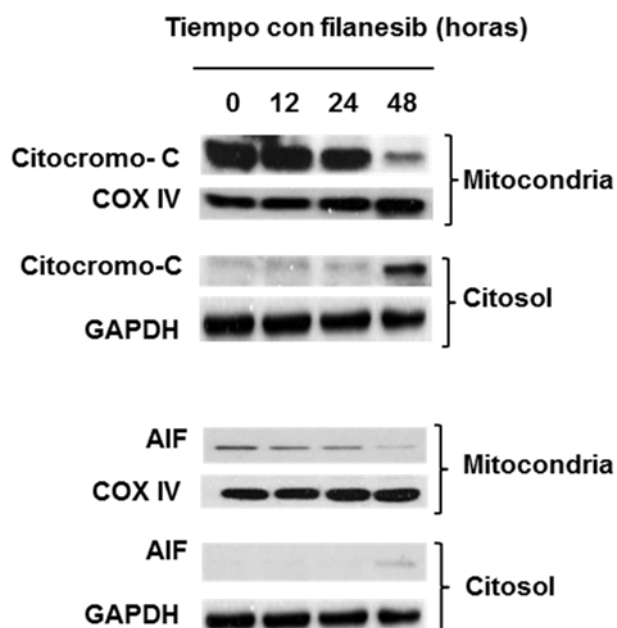
| Tiempo (horas) | 0 | 12 | 24 | 48 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|
| DiOC6(-) | 22% | 47% | 71% | 89% |



| Tiempo (horas) | 0 | 12 | 24 | 48 |
|----------------|----|----|-----|-----|
| DiOC6(-) | 7% | 9% | 14% | 38% |

Tras comprobar que la mitocondria estaba alterada se estudió si estas alteraciones se traducían en un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y la consecuente liberación de factores apoptogénicos del espacio intermembrana al citosol. Para ello, se hizo un fraccionamiento subcelular en la línea MM.1S tratada con filanesib durante 12, 24 y 48 horas y se analizó por Western blot la expresión de citocromo-C y de AIF en la mitocondria y en el citosol. Se confirmó que ambas proteínas se liberaban al citosol, sobre todo citocromo-C con una clara disminución de su expresión en la mitocondria y un aumento del mismo en el citosol a 48 horas (Figura 1. 24).

Figura 1.24 Liberación de los factores apoptogénicos, citocromo-C y AIF, desde la mitocondria al citosol en MM.1S tras tratamiento con filanesib 10 nM a tiempos crecientes. Imagen representativa de dos experimentos independientes.



8. ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA FAMILIA BCL-2 EN LA EFICACIA DE FILANESIB.

Una vez demostrado que filanesib induce permeabilización de la membrana mitocondrial externa y apoptosis, se evaluó por Western blot en las

11 líneas celulares de MM ya estudiadas, la expresión basal de seis proteínas de la familia Bcl-2 que son claves en el control de este proceso, bien favoreciéndolo y promoviendo la apoptosis (Bad, Bak, Bax), o impidiéndolo y promoviendo la supervivencia (Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-xl) (Figura 1.25). Se observó que las distintas líneas celulares mostraban diferentes grados de expresión de cada proteína y que todas las células expresaban una elevada cantidad de la proteína antiapoptótica Mcl-1. Se estudió entonces la posible correlación de la expresión basal de estas proteínas con la sensibilidad a filanesib a 48 horas. A diferencia de lo reportado previamente, no se observó correlación entre los niveles de Mcl-1 y la sensibilidad a filanesib en este estudio. Únicamente, se observó una correlación directa entre los niveles de la proteína proapoptótica Bax y la sensibilidad a filanesib; así, las líneas celulares con mayores niveles basales de Bax fueron particularmente sensibles este fármaco ($P < 0.05$) (Figura 1.26). Por el contrario, no se observó correlación entre la expresión de Bax y la sensibilidad al inhibidor del proteasoma bortezomib ($P > 0.05$).

Figura 1.25 Análisis de los niveles basales de proteínas de la familia Bcl-2 en líneas celulares de MM. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

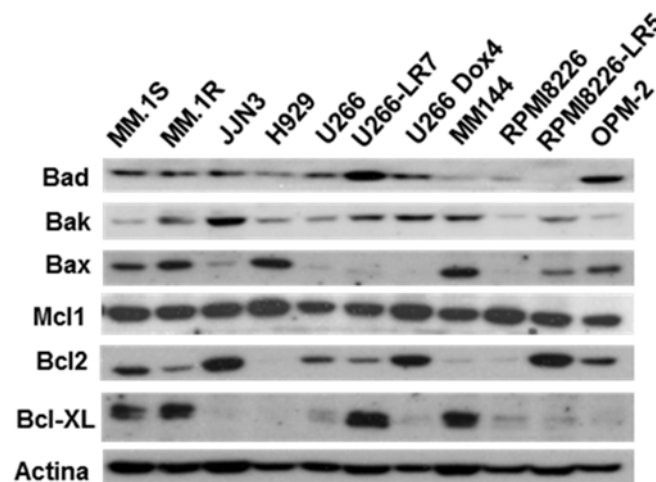
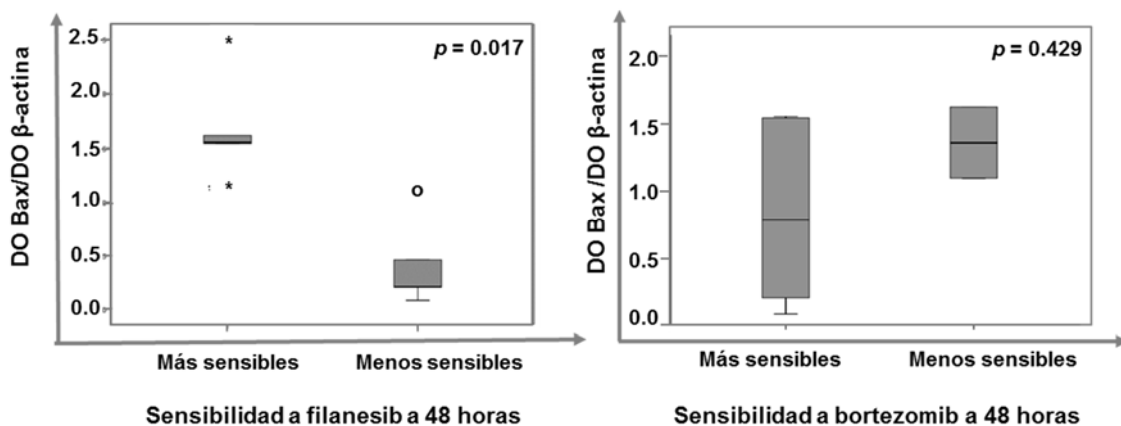
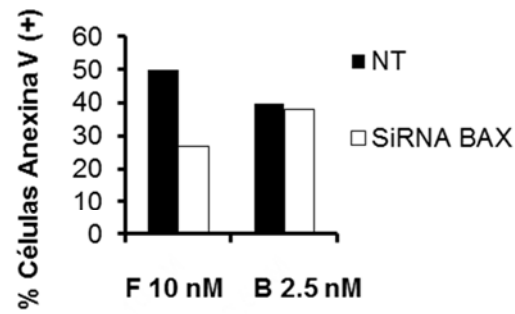
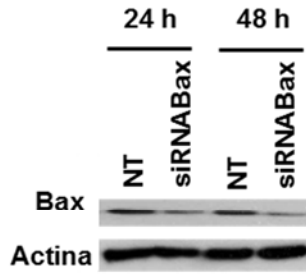


Figura 1.26 Diagrama de cajas de la sensibilidad a filanesib o a bortezomib y su relación con los niveles basales de la proteína proapoptótica Bax, realizado tras el análisis del experimento anterior.



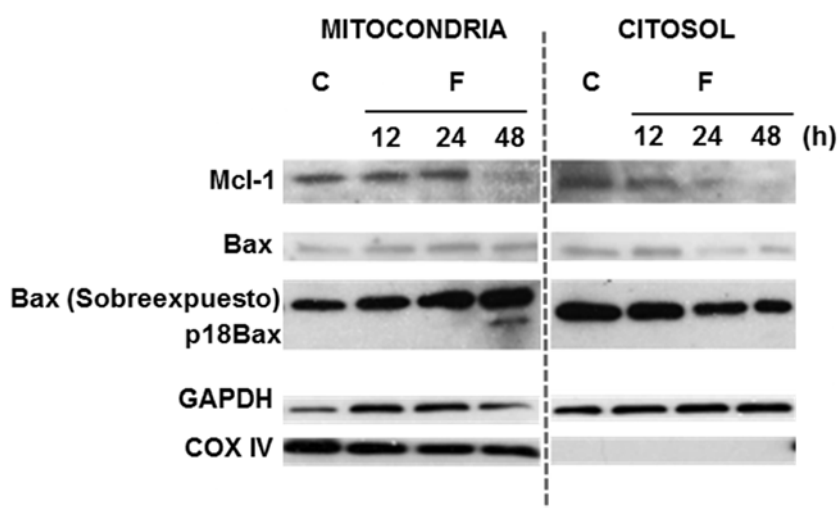
Para confirmar la influencia de Bax sobre la sensibilidad a filanesib, se transfectó la línea celular MM.1S con un siRNA específico de Bax (siRNABax). Tras analizar la expresión de Bax por Western blot y comprobar que efectivamente las células siRNABax tenían una muy baja expresión de la proteína en relación con las células control (Non-targeting control short interfering RNA; NT), se trataron durante 24 horas con filanesib o con bortezomib y se midió la apoptosis por Anexina V (Figura 1.27). El porcentaje de células en apoptosis tras tratamiento con filanesib disminuyó de un 50 % en las células control a un 27 % en células con Bax silenciado, indicando que la disminución de la expresión de Bax afectaba a la eficacia de filanesib. Sin embargo, esta disminución de Bax no afectó a la eficacia de bortezomib, el porcentaje de células en apoptosis fue similar en el control y en las células con Bax silenciado.

Figura 1.27 Análisis del efecto del silenciamiento de Bax en la supervivencia de células MM.1S (NT: Non-targeting control short interfering RNA, transfectadas sin el siRNA, control; siRNABax: transfectadas con un siRNA específico de Bax) tratadas con filanesib (F) 10 nM o con bortezomib (B) 2.5 nM durante 24 horas.



Para analizar la actividad de Bax y Mcl-1, se estudió su expresión proteica en la mitocondria y en el citosol mediante fraccionamiento subcelular de células MM.1S tratadas con filanesib a diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas) (figura 1.28). Se observó que filanesib indujo la activación temprana de Bax por translocación de esta proteína desde el citosol a la mitocondria. Además, en la mitocondria, a las 48 horas de tratamiento Bax se excindió en su fragmento proapoptótico más activo de 18 KDa (p18Bax) ¹⁹¹. Por otra parte, se confirmó que el tratamiento con filanesib inducía una disminución gradual de la expresión de Mcl-1 en ambos compartimentos subcelulares, tras 24 horas en el citosol y tras 48 horas de tratamiento en la mitocondria.

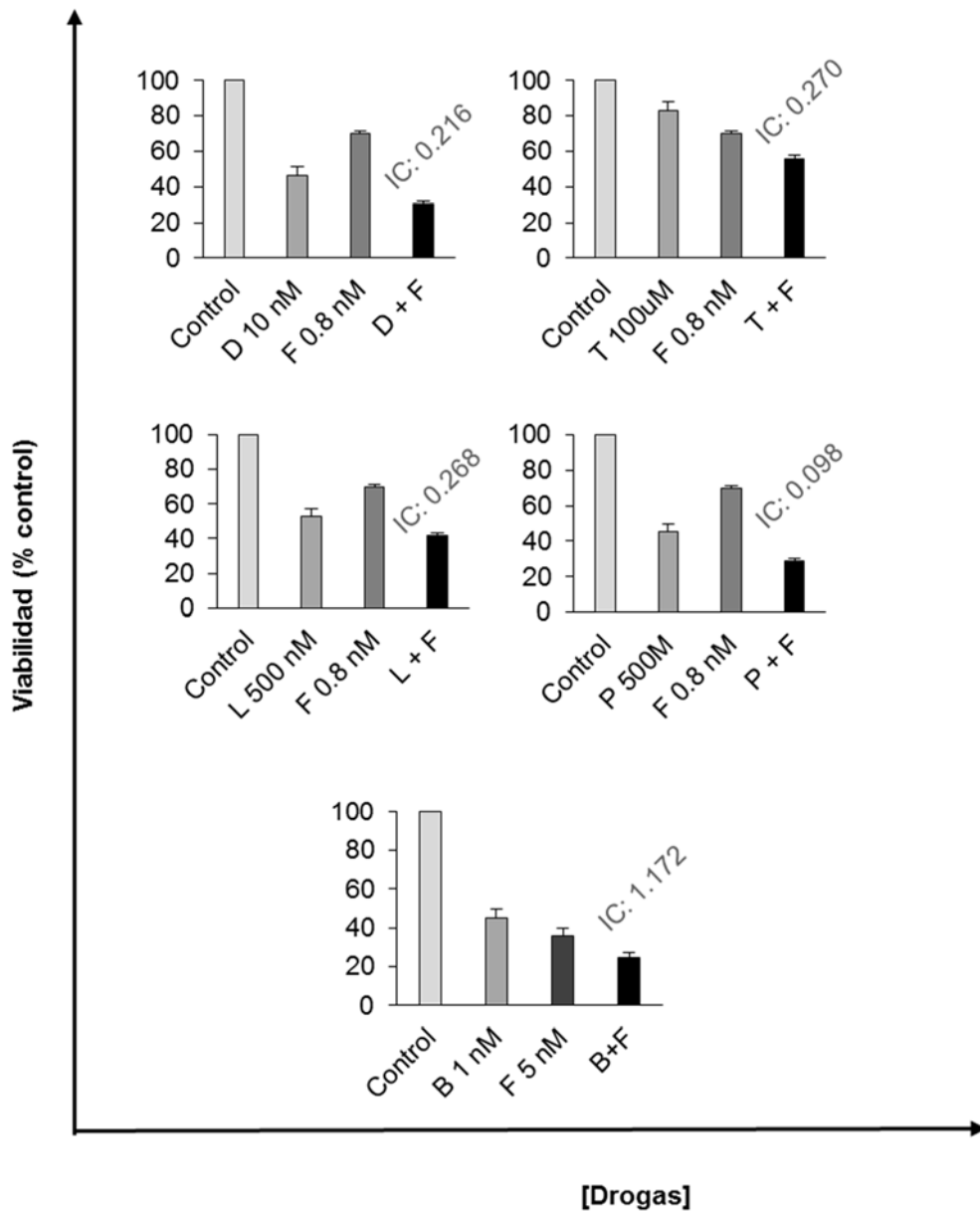
Figura 1.28 Análisis de la expresión de la proteína antiapoptótica Mcl-1 y de la proteína proapoptótica Bax en la mitocondria y en el citosol de la línea celular MM.1S tratada con filanesib 10 nM a tiempos crecientes. Imagen representativa de dos experimentos independientes.



9. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA PRECLÍNICA DE FILANESIB EN COMBINACIÓN CON OTROS FÁRMACOS UTILIZADOS EN LA CLÍNICA HABITUAL DEL MM.

Posteriormente se decidió estudiar la eficacia preclínica de filanesib *in vitro* en combinación con diversos fármacos anti-mieloma para identificar las combinaciones que pudieran ser más eficaces en clínica. Para ello, se trataron las células MM.1S con diferentes concentraciones de filanesib junto con dexametasona (D), talidomida (T), lenalidomida (L), pomalidomida (P) o bortezomib (B) durante 48 horas, evaluándose la potencia de las combinaciones mediante el cálculo del índice de combinación (IC) por el programa calcsyn. Filanesib mejoró la eficacia de todos los tratamientos anti-mieloma, siendo dexametasona y pomalidomida los fármacos con menor IC, es decir mayor sinérgismo. Sin embargo, y a pesar de que se ha evaluado en clínica en combinación con bortezomib, la combinación con bortezomib mostró un IC antagónico a la dosis y tiempo evaluado (Figura 1.29).

Figura 1.29 Efecto de filanesib en combinación con otros fármacos anti-mieloma sobre la línea celular MM.1S y valores del índice de combinación (IC) calculado con el programa calcsyn a 48 horas. Gráficos representativos de dos experimentos independientes.



10. ANÁLISIS DE LA EFICACIA Y EL MECANISMO DE ACCIÓN FILANESIB EN EL MM. DISCUSIÓN.

El único evento, que, hasta la fecha ha demostrado ser común a prácticamente todos los pacientes con MM (98%) es la desregulación de la Ciclina-D ¹⁹². Este hallazgo ha promovido la investigación de fármacos que actúan sobre el ciclo celular para el tratamiento de esta enfermedad. Así, se han evaluado inhibidores de CDK 4-6 (como el Seliciclib) ^{164,165}, en combinación con bortezomib y dexametasona e inhibidores de Aurora Kinasa pero ninguno de ellos ha mostrado un balance riesgo beneficio adecuado en los estudios pilotos realizados en el ámbito clínico ^{166, 193}. En los últimos años, se ha desarrollado un fármaco con un nuevo mecanismo de actuación, filanesib (ARRY-520), cuya acción es la inhibición de la “kinesin spindle protein”, proteína necesaria para la correcta formación del huso mitótico, y cuya eficacia es mayor en tumores dependientes de la proteína antiapoptótica Mcl-1, como es el caso del MM ¹⁷⁴. Así, la eficacia de este fármaco se ha testado en preclínica ¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ y en clínica tanto en tumores sólidos ¹⁹⁷ como cánceres hematológicos ¹⁹⁸ y ha resultado ser especialmente eficaz en el MM, demostrando en torno a un 16% de respuestas, tanto en monoterapia como en combinación con dexametasona, en pacientes sin ninguna alternativa terapéutica ^{168, 199}. En este contexto, este trabajo ha evaluado la eficacia preclínica *in vitro* e *in vivo* de filanesib en el MM y las claves de su mecanismo de acción para poder predecir y mejorar la respuesta en estos pacientes.

Con filanesib se ha identificado una posible nueva diana terapéutica en el MM, la proteína KSP. Hasta la fecha no había ninguna información sobre el impacto que puede tener esta proteína en el MM. En primer lugar, se evaluó si esta proteína se expresaba de forma diferente en los pacientes con MM y si su expresión tenía algo que ver con el desarrollo de la enfermedad, con el pronóstico de la misma y con la supervivencia global en pacientes. Teniendo en cuenta que la proteína KSP se expresa únicamente en células en proliferación ²⁰⁰ y que las células plasmáticas de pacientes con MM suelen proliferar poco, sería probable que la expresión de esta proteína en MM no fuera muy relevante en pacientes. Acorde con esto, los niveles de expresión génica de la KSP no se

correlacionaron con la presencia de enfermedad, ni con las translocaciones de peor pronóstico. Es más, nuestros análisis indicaron que la expresión génica de KSP en células plasmáticas de individuos sanos tendía a ser mayor que en las células plasmáticas mielomatosas, aunque estas diferencias no fueron significativas. En cuanto a los análisis de supervivencia, los pacientes que tienen una mayor expresión génica de KSP presentaron una menor supervivencia. Este hallazgo podría tener bastante sentido puesto que los pacientes con MM avanzado, con peor pronóstico, suelen tener una tasa de proliferación tumoral mayor ²⁰¹⁻²⁰⁹. Además, estos datos podrían estar sugiriendo que este grupo de pacientes menos favorecidos podrían beneficiarse con el tratamiento con filanesib y apoyarían el uso actual de este agente en la clínica del MM.

Al ser filanesib un fármaco que actúa en el ciclo celular, en fases tempranas de la mitosis, podría ser especialmente activo en células muy proliferativas como es el caso de líneas celulares humanas cultivadas *in vitro* o expandidas en tumores xenograft en ratones. Así, en nuestros estudios, filanesib mostró eficacia en todas las líneas celulares de MM, siendo muy rápido en su acción; en tan solo quince minutos fue capaz de mostrar su máxima eficacia. Acorde con los resultados observados en clínica, filanesib fue especialmente eficaz en líneas celulares que responden peor a tratamientos anti-mieloma convencionales, como OPM-2 o RPMI-8226-LR5. Esta eficacia también se observó en presencia de factores presentes en microambiente del MM que confieren ventaja proliferativa a las células de MM. Los datos *in vivo* también apoyan la eficacia de filanesib retrasando el crecimiento tumoral de los plasmocitomas y mejorando de manera significativa la supervivencia de los ratones con un moderado impacto en la toxicidad.

Atendiendo al mecanismo de acción de filanesib, nuestros estudios *in vitro* demostraron que todas las células que responden a filanesib expresaban KSP y que la mayor expresión de ésta se asociaba con una mejor respuesta, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, sugiriendo la existencia de otras causas responsables de su eficacia en MM.

Desde que los inhibidores de KSP se presentaron como alternativa terapéutica a los fármacos antimitóticos clásicos, como son los taxanos, los epotilones y los alcaloides de vinca, debido a su menor impacto en la toxicidad¹⁷¹, su actividad antitumoral ha sido ampliamente estudiada, tanto en el ámbito preclínico^{171, 205-208} como en el clínico^{209, 210}. Como parte de su mecanismo, se ha estudiado que al inhibir a la KSP se induce la formación de husos monoporales, parada en mitosis y en última instancia, muerte por apoptosis¹⁷⁶. Teniendo esto como precedente, se evaluó el mecanismo de acción de filanesib en el MM. Nuestros resultados *in vitro* demostraron que efectivamente filanesib inhibe a la proteína KSP induciendo la formación de husos monopolares y provocando una acumulación de células en G₂/M. Tras esta inhibición, filanesib causó pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, su consecuente permeabilización y finalmente apoptosis, aumentando el número de células Anexina V+ y con procesamiento de PARP-1.

Por otra parte, estudios previos han demostrado que la degradación de Mcl-1 por parte de las caspasas está implicada en la inducción de la apoptosis^{211, 212}. En este contexto, las caspasas podrían estar facilitando la degradación de Mcl-1, entre otros sustratos, y por ello la muerte inducida por este fármaco. Nuestros resultados apoyaron esta hipótesis, ya que en ellos observamos que la apoptosis inducida por filanesib se desencadenó por un mecanismo independiente de caspasas, que fue parcialmente acompañado de un mecanismo dependiente de caspasas en las células más sensibles.

La eficacia de fármacos antimitóticos sobre células tumorales viene determinada un sutil balance entre los niveles de expresión proteica de miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 y su localización subcelular²¹³⁻²¹⁶. Datos previos han asociado la activación de la proteína proapoptótica Bax con la inducción de la apoptosis por un fármaco inhibidor de KSP en cáncer de mama^{217, 218}. En nuestros estudios el silenciamiento de Bax redujo la actividad del tratamiento con filanesib. Además, se demostró que filanesib inducía una activación temprana de la proteína pro-apoptótica Bax por translocación del citosol a la mitocondria. Estos datos presentaron a Bax como un posible biomarcador de respuesta a filanesib.

Como se comentó al inicio del capítulo, filanesib ha resultado ser eficaz clínicamente en combinación con dexametasona en pacientes con MM¹⁶⁸. Por otra parte, un estudio previo ha demostrado la mejora de la eficacia *in vivo* de filanesib con un fármaco inmunomodulador, la pomalidomida ²¹⁹. Al evaluar preclínicamente la eficacia *in vitro* de estas combinaciones, se confirmó su sinergismo, y la profundización en esta combinación será el objetivo del segundo capítulo del presente trabajo de tesis doctoral.

CAPÍTULO II. EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA EFICACIA Y MECANISMO DE ACCIÓN DE FILANESIB EN COMBINACIÓN CON POMALIDOMIDA Y DEXAMETASONA EN MIELOMA MÚLTIPLE

Pacientes con MM que habían sido previamente resistentes a la mayoría de los tratamientos disponibles respondieron al tratamiento con filanesib en los ensayos clínicos fase I/II. Este hallazgo ha promovido la búsqueda de posibles combinaciones de este agente con algunas de las terapias más atractivas para esta enfermedad, con el fin de mejorar esta actividad anti-mieloma. En concreto, se ha evaluado en combinación con bortezomib, en un ensayo en Fase I en monoterapia y en combinación con dexametasona ¹⁷⁷; así como en combinación con carfilzomib ^{178, 179}. Recientemente, pomalidomida en combinación con dexametasona ha demostrado unas respuestas globales del 30%, con una supervivencia libre de progresión (SLP) de 4 meses y ha prolongado hasta un año la supervivencia global en pacientes refractarios a fármacos inmunomoduladores (IMiD) e inhibidores de proteasoma ^{125, 127}.

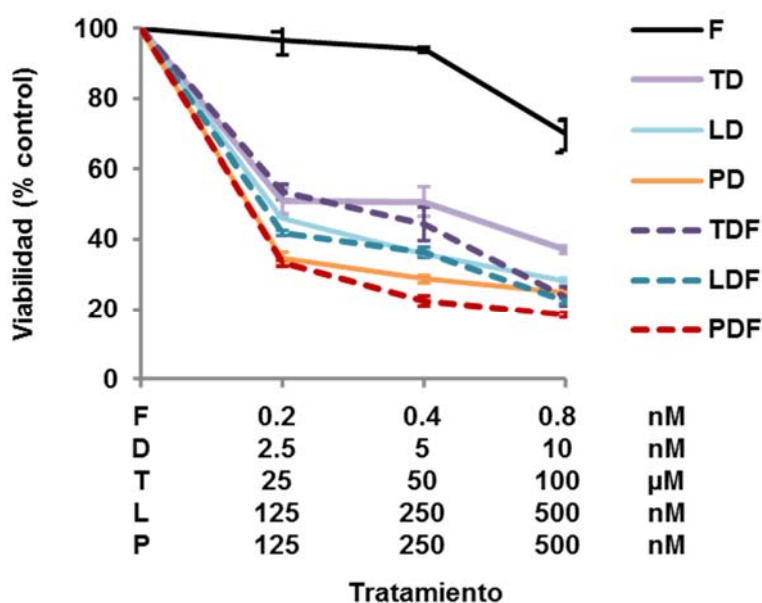
Datos previos han demostrado que la pomalidomida potencia la eficacia *in vivo* de filanesib. En base a estos resultados, se planteó la hipótesis de que la triple combinación pomalidomida + dexametasona + filanesib (PDF), podría mejorar la respuesta en pacientes con MM. En el presente capítulo se presentan los resultados preclínicos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* realizados con esta combinación. Parte de los resultados obtenidos en estos estudios fueron la base para el ensayo clínico POMDEFIL en fase II (clinicaltrials.gov Identificador: 02384083) ²²⁰ en el que se está evaluando esta combinación en pacientes con MM refractario o en recaída.

1. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE POMALIDOMIDA MÁS DEXAMETASONA CON FILANESIB SOBRE LÍNEAS CELULARES DE MM Y MUESTRAS DE PACIENTES *EX VIVO*.

En primer lugar, se evaluó la eficacia *in vitro* de varios IMiD que habitualmente se usan en la clínica del MM con dexametasona (D) en combinación con filanesib. Para ello, células MM.1S se trataron durante 48 horas

con diferentes dosis de talidomida y dexametasona (TD), lenalidomida y dexametasona (LD) o pomalidomida y dexametasona (PD) solos y en combinación con filanesib. Transcurrido este tiempo, se analizó la citotoxicidad mediante la técnica del MTT (Figura 2.1).

Figura 2.1 Análisis de la viabilidad celular de células MM.1S tratadas con TD, LD, PD y F solo o en combinación durante 48h. Gráfico representativos de dos experimentos independientes.



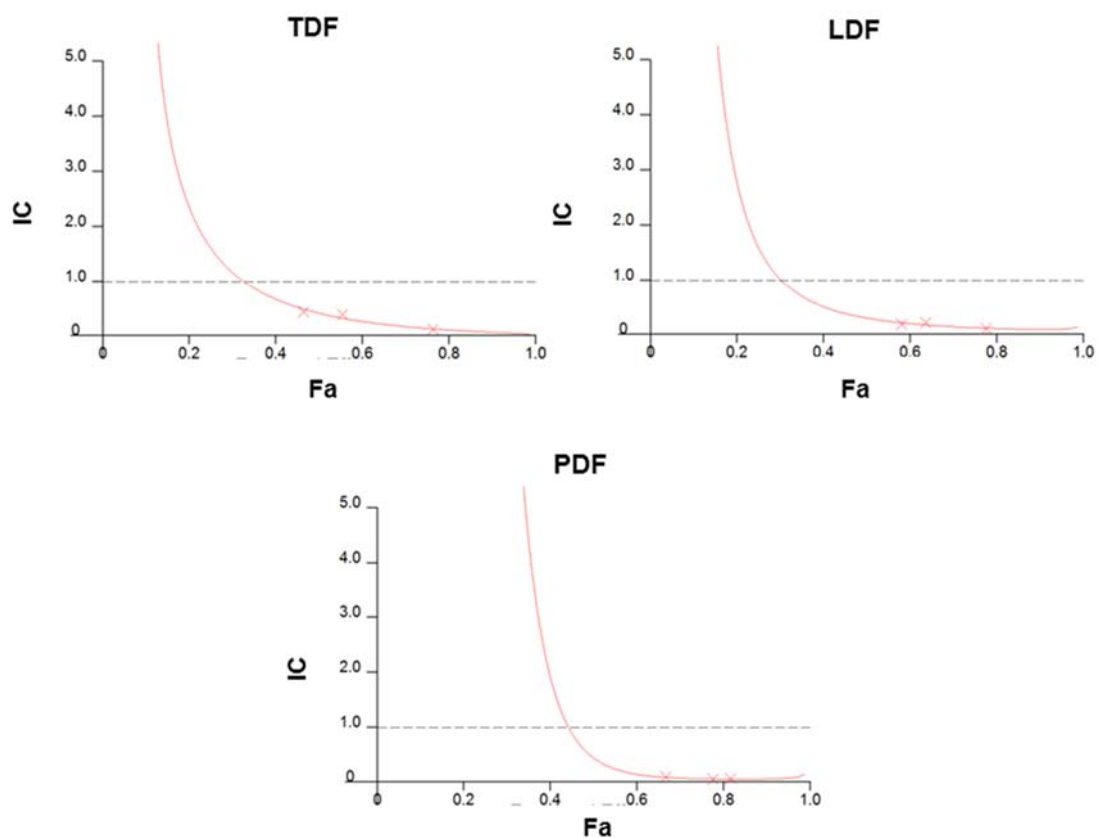
Se observó que todos los IMiD combinados con dexametasona mejoraron su eficacia al añadir filanesib, con índices de combinación (IC) en el rango sinérgico, siendo de 0.112, 0.103 y 0.063 para TDF, LDF y PDF, respectivamente (Tabla 2.1). Sin embargo, la combinación PDF fue la más eficaz y la que presentó mejores índices de combinación, siendo estos más cercanos a cero.

Tabla 2.1 Índices de combinación (IC) y fracción de células MM.1S afectadas por el tratamiento (Fa).

| T | L | P | D | F | Fa | IC |
|-------------------|------|------|------|------|-------|-------|
| (μM) | (nM) | (nM) | (nM) | (nM) | | |
| 25 | - | - | 2.5 | 0.2 | 0.464 | 0.435 |
| 50 | - | - | 5 | 0.4 | 0.555 | 0.390 |
| 100 | - | - | 10 | 0.8 | 0.764 | 0.112 |
| - | 125 | - | 2.5 | 0.2 | 0.580 | 0.189 |
| - | 250 | - | 5 | 0.4 | 0.636 | 0.217 |
| - | 500 | - | 10 | 0.8 | 0.776 | 0.103 |
| - | - | 125 | 2.5 | 0.2 | 0.667 | 0.095 |
| - | - | 250 | 5 | 0.4 | 0.776 | 0.051 |
| - | - | 500 | 10 | 0.8 | 0.817 | 0.063 |

Las dosis establecidas fueron seleccionadas para mantener una ratio constante en combinación, esto permitió realizar una estimación algebraica del índice de combinación para cada fracción de células MM.1S afectadas que se representa en la Figura 2.2. Los gráficos se representaron teniendo en cuenta los valores de Fa para cada fármaco individual y la Fa obtenida en la combinación. Al analizarlos, se comprobó que la triple combinación PDF fue la más eficiente, puesto que presentó valores de IC muy sinérgicos (cercaos a 0) y altamente eficaces (más cercanos al valor 1).

Figura 2.2 Análisis del sinergismo en la línea celular MM.1S de las combinaciones triples TDF, LDF y PDF mediante gráficos en los que se representa el índice de combinación frente a la fracción de células afectadas para cada tratamiento.



En base a estos datos y al ser la combinación de pomalidomida con dexametasona particularmente atractiva en el ámbito clínico, se decidió profundizar preclínicamente en esta combinación. En primer lugar, se demostró su eficacia en otras líneas celulares de MM; MM144, JJN3, RPMI-8226-LR5 y OPM-2; siendo la combinación PDF eficaz en todas ellas y mostrando, en la mayoría de ellas (con la salvedad de la línea JJN3), unos IC en el rango sinérgico. La línea celular JJN3 a pesar de mejorar su eficacia con PDF no mostró sinergismo a dosis bajas, y necesitó dosis mayores para demostrar sinergismo preclínico (Figura 2.3 y tabla 2.2).

Figura 2.3 Análisis de la viabilidad celular por la técnica MTT de las líneas MM144, JJN3, RPMI-8226-LR5 y OPM-2 tratadas a dosis crecientes y a ratio constante con PD y F solo o en combinación durante 48h (Dosis empleadas de cada fármaco siguiendo el orden 1, 2, 3 del eje de abscisas: P= 62.5, 125 y 250 nM; D= 1.25, 2.5 y 5 nM; F=0.15, 0.3 y 0.6 nM).

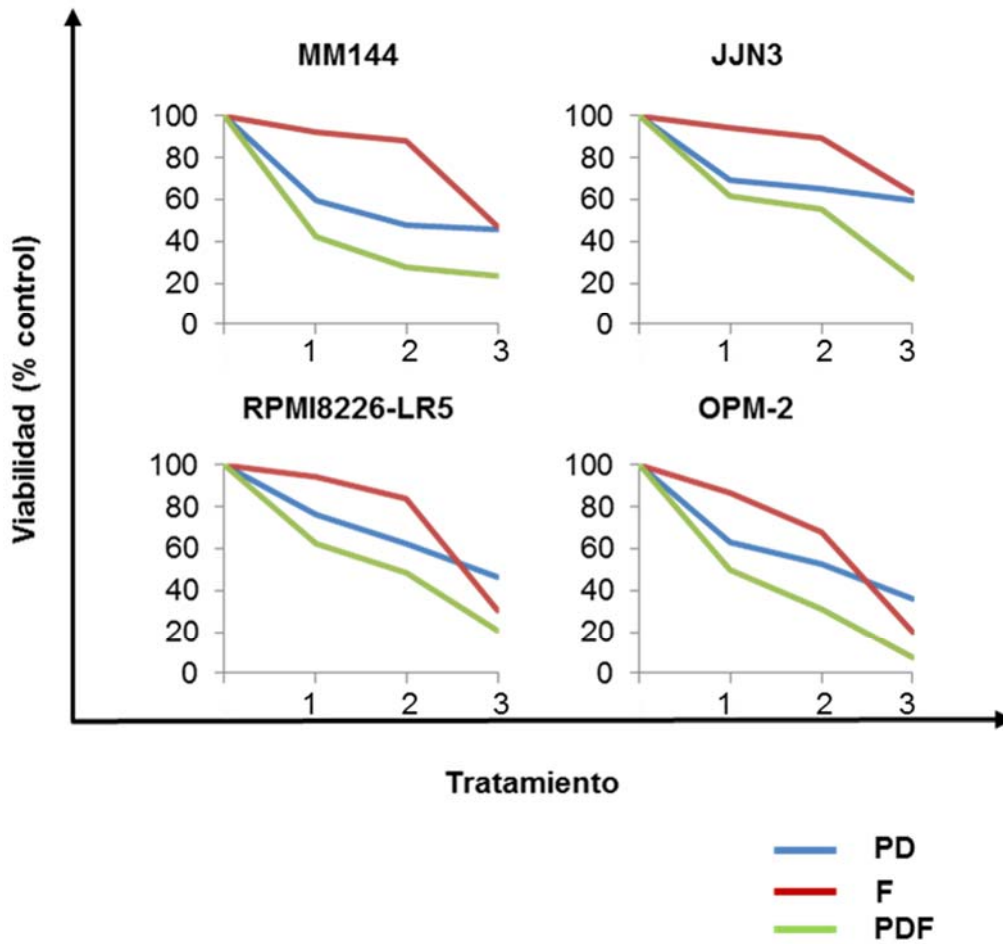


Tabla 2.2 Índices de combinación (IC) y fracción de células afectadas por el tratamiento (Fa) de las líneas celulares MM144, JJN3, RPMI-LR5 y OPM-2 obtenidos tras el análisis del experimento anterior utilizando el programa Calculusyn.

MM144

| P (nM) | D (nM) | F (nM) | Fa | IC |
|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|-----------|
| 62.5 | 1.25 | 0.15 | 0.574 | 0.220 |
| 125 | 2.5 | 0.3 | 0.720 | 0.293 |
| 250 | 5 | 0.6 | 0.766 | 0.511 |

JJN3

| P (nM) | D (nM) | F (nM) | Fa | IC |
|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|-----------|
| 62.5 | 1.25 | 0.15 | 0.380 | 201.485 |
| 125 | 2.5 | 0.3 | 0.445 | 17.610 |
| 250 | 5 | 0.6 | 0.780 | 0.452 |

**RPMI-
8226-LR5**

| P (nM) | D (nM) | F (nM) | Fa | IC |
|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|-----------|
| 62.5 | 1.25 | 0.15 | 0.377 | 0.392 |
| 125 | 2.5 | 0.3 | 0.512 | 0.606 |
| 250 | 5 | 0.6 | 0.792 | 0.684 |

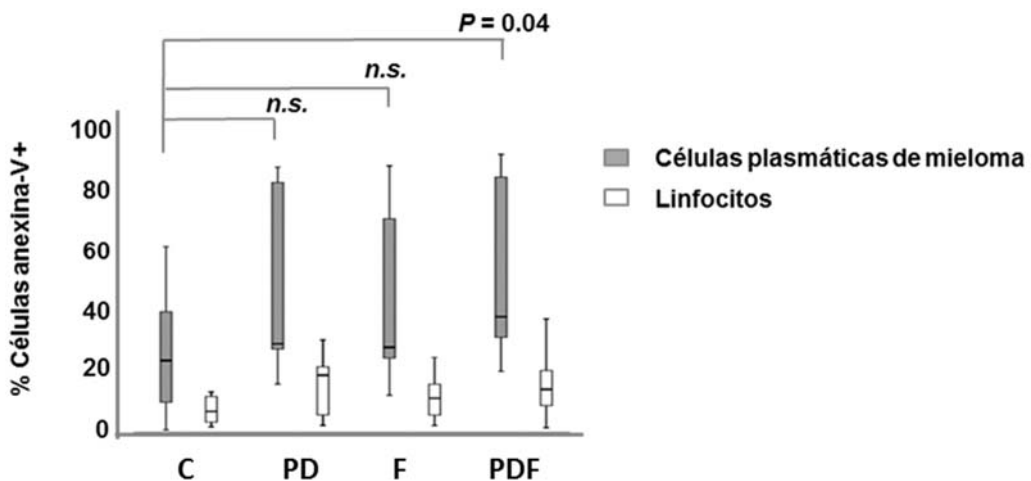
OPM-2

| P (nM) | D (nM) | F (nM) | Fa | IC |
|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|-----------|
| 62.5 | 1.25 | 0.15 | 0.502 | 0.376 |
| 125 | 2.5 | 0.3 | 0.690 | 0.469 |
| 250 | 5 | 0.6 | 0.925 | 0.356 |

Una vez demostrada la eficacia y el sinergismo de la combinación PDF en diferentes líneas celulares de MM, se analizó su eficacia *ex vivo* en células

plasmáticas patológicas procedentes de aspirados de médula ósea (MO) de 9 pacientes diagnosticados de MM y su potencial toxicidad en linfocitos no tumorales de las mismas muestras. Las muestras se incubaron con los diferentes tratamientos durante 48 horas, y la apoptosis (células Anexina V positivas) se analizó tanto en las células plasmáticas tumorales como en los linfocitos normales por citometría de flujo (Figura 2.4). Los resultados se muestran en un diagrama de cajas basado en cuartiles, que nos permite observar la distribución de los datos. El tratamiento con PD, F y PDF indujo apoptosis en las células plasmáticas mielomatosas. Sin embargo, únicamente PDF demostró una apoptosis significativa respecto a las células plasmáticas control (PDF vs. C, $P = 0.04$). A su vez, los linfocitos de los pacientes con MM tratados con PDF no presentaron una apoptosis significativa respecto a los linfocitos control. Este hecho sugiere la existencia de una ventana terapéutica para esta combinación.

Figura 2.4 Diagrama de cajas del análisis de eficacia de PDF en células plasmáticas de MO de 9 pacientes con MM (C= células control, sin tratamiento; P= pomalidomida, 500 nM; D=dexametasona, 10nM; F= filanesib, 1nM).



2. ANÁLISIS DE LA EFICACIA ANTI-MIELOMA DE POMALIDOMIDA Y DEXAMETASONA EN COMBINACIÓN CON FILANESIB EN PRESENCIA DE CITOQUINAS Y CÉLULAS PROPIAS DEL MICROAMBIENTE DEL MM.

Se evaluó la eficacia de la combinación en presencia de citoquinas o células presentes en el microambiente de la médula ósea (MO). En primer lugar, se comprobó si la triple combinación era capaz de inhibir la ventaja proliferativa, de supervivencia y resistencia a tratamientos conferida por las citoquinas IGF1 e IL6, que son secretadas por las células del microambiente medular tras adherirse a las células de mieloma. Para ello, se cultivó la línea celular MM.1S en presencia de las mismas durante 48 horas. Se observó que la triple combinación mantuvo su eficacia incluso en presencia de estos dos factores (Figura 2.5). Posteriormente, se evaluó la eficacia de la combinación PDF en la línea celular MM1S-luc en co-cultivo con células mesenquimales estromales derivadas de pacientes con MM (pBMSCs) y de la línea celular estromal (hMSC-TERT). La triple combinación, también en estas condiciones, mostró eficacia, mejorando la eficacia de los agentes solos o en combinación doble (Figura 2.6). Cabe destacar que, en todos los experimentos, la triple combinación fue más eficiente en presencia de componentes del microambiente medular que en ausencia del mismo, puesto que partiendo de una viabilidad de un 40 a un 80% superior a la del control, el porcentaje de eficacia fue similar. En base a estas observaciones y dado que filanesib es un fármaco anti proliferativo, la combinación PDF podría estar potenciando su mecanismo y ser más eficaz en células que presentan una mayor tasa de proliferación. Esta hipótesis se intentó confirmar más adelante.

Figura 2.5 Eficacia de PDF en células MM.1S en presencia de IGF1 o IL6 a 48 horas (P= 500 nM; D= 10 nM; F= 1nM). Viabilidad celular medida como porcentaje de metabolización del MTT. Gráficos representativos de dos experimentos independientes.

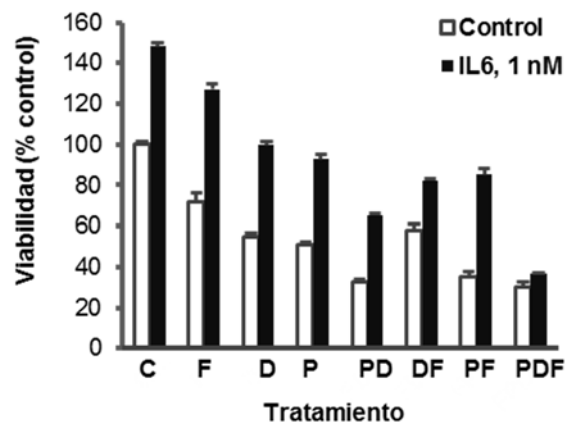
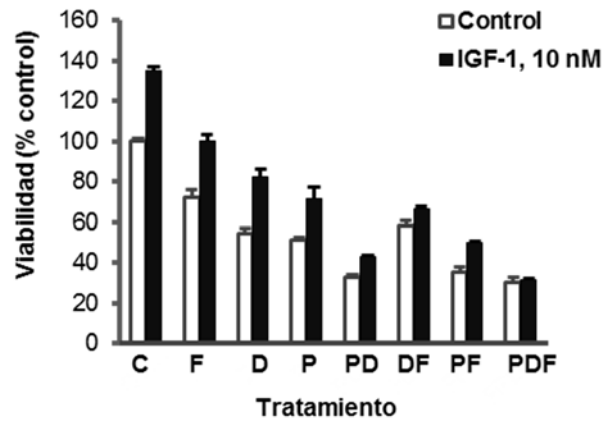
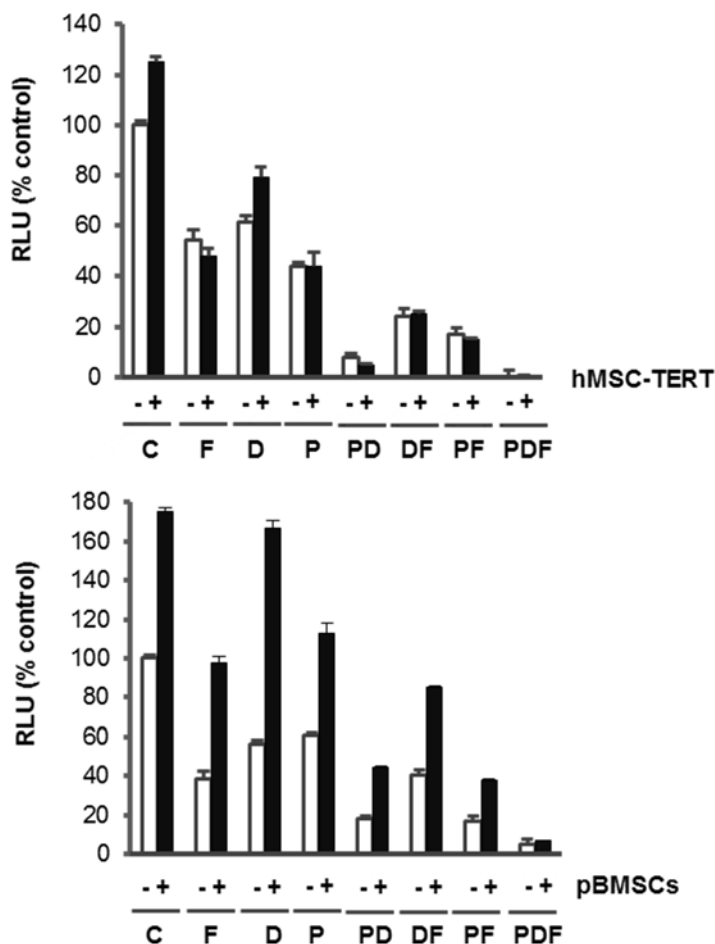


Figura 2.6 Eficacia de PDF en células MM.1S-luc en co-cultivo con hMSC-TERT y pBMSCs Viabilidad celular medida mediante bioluminiscencia y cuantificada por RLU (unidades de luminiscencia relativa) (P= 500 nM; D= 10 nM; F= 1nM). Gráficos representativos de dos experimentos independientes.

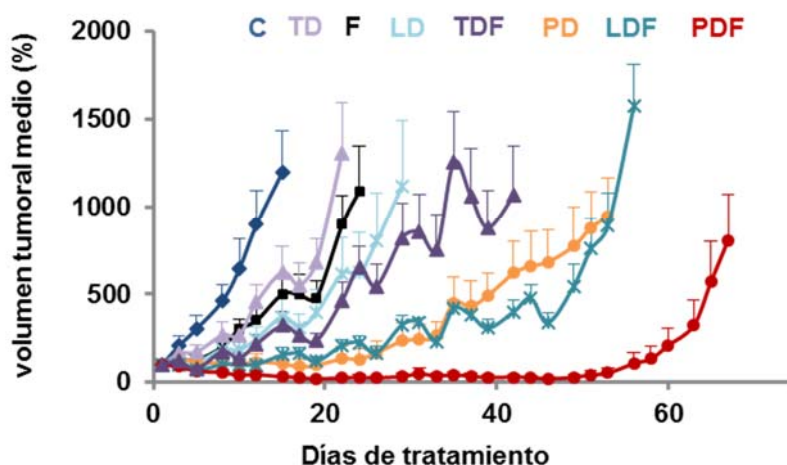


5. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA *IN VIVO* DE POMALIDOMIDA Y DEXAMETASONA EN COMBINACIÓN CON FILANESIB EN UN MODELO MURINO DE PLASMOCITOMA HUMANO.

Para determinar si la triple combinación tenía un comportamiento *in vivo* similar al observado *in vitro* y *ex vivo*, se inyectaron, por vía subcutánea, 3×10^6 células MM.1S en ratones CB17-SCID. Una vez que los ratones desarrollaron tumores palpables, se aleatorizaron a recibir los siguientes tratamientos administrados por vía intraperitoneal (n=6 ratones por grupo): vehículo (grupo control), filanesib en monoterapia (10 mg/kg, 2 días por semana), talidomida (50

mg/kg, 5 días por semana) en combinación con dexametasona (0.5 mg/kg, 2 días por semana), lenalidomida (25 mg/kg, 5 días a la semana) con dexametasona, pomalidomida (8 mg/kg, 5 días por semana) con dexametasona, y las respectivas triples combinaciones siguiendo las mismas pautas de dosis y días en cada grupo de tratamiento (Figura 2.7). El tratamiento comenzó cuando los ratones alcanzaron un volumen tumoral entre 30 y 237 mm³, siendo la media del volumen tumoral por grupo de 125 mm³, y se mantuvo hasta que los ratones tuvieron que ser sacrificados por el elevado tamaño del tumor o por los efectos tóxicos del tratamiento. En este estudio, se observó que todos los tratamientos fueron eficaces, puesto que retrasaron el crecimiento de los tumores, con respecto a los controles. Aunque, la adición de filanesib a los tratamientos TD, LD, PD mejoró la eficacia de los mismos, con una menor tasa de crecimiento tumoral, la combinación PDF fue la más eficaz, presentando diferencias significativas con respecto a la terapia estándar PD desde el día 26 de tratamiento. Además, durante 50 días frenó completamente el crecimiento tumoral, siendo significativamente más eficaz que TDF y LDF ($p < 0.05$, desde el día 8 y 10 de tratamiento, respectivamente).

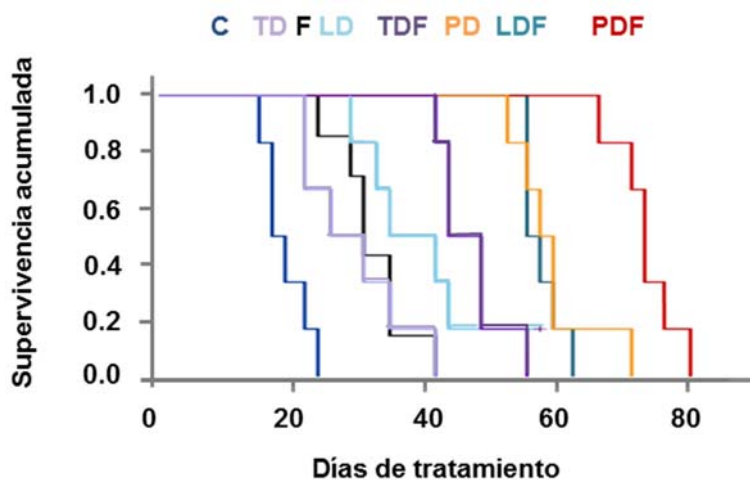
Figura 2.7 Evolución del volumen tumoral de los plasmocitomas subcutáneos desde el inicio del tratamiento.



Acorde con estos resultados, se observó una significativa mejora en la supervivencia de los ratones tratados con PDF respecto a los tratados con PD con una mediana de supervivencia de 74 días (rango, 71-76) a diferencia de la

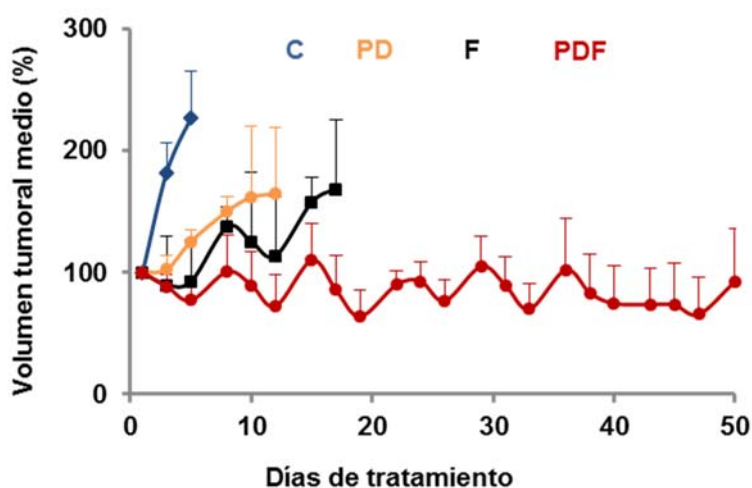
obtenida con la terapia estándar PD, que presentó una mediana de supervivencia de 56 días (rango, 55-61) (Log-Rank test, $p = 0.004$). Asimismo, la supervivencia de los ratones tratados con PDF fue significativamente mayor que la de los tratados con TDF o LDF (log-Rank, $p < 0.001$ al comparar PDF con TDF o con LDF) (Figura 2.8).

Figura 2.8 Supervivencia de los distintos grupos de tratamiento en el modelo xenograft de MM representada por curvas de Kaplan-Meier.



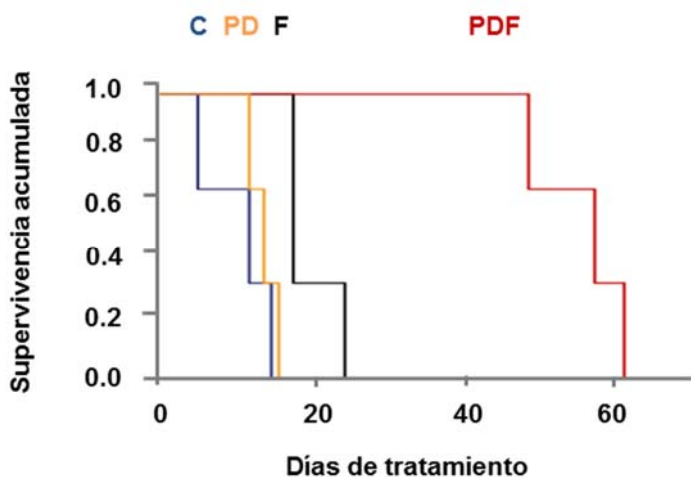
Como se ha mencionado previamente, al ser filanesib un fármaco eficaz en células que están dividiéndose, la combinación de PDF podría ser particularmente activa en células altamente proliferativas. Para comprobarlo, se evaluó el efecto de PDF en ratones con plasmacitomas grandes, cuya fase de crecimiento es exponencial. Para ello, se procedió de la misma manera que en el experimento anterior (utilizando el mismo modelo y tipo de ratón, la misma línea celular y esquema de tratamiento), pero comenzando a tratar cuando los ratones alcanzaron un volumen tumoral mucho mayor, entre 1617 - 3134 mm³, siendo la media del volumen tumoral por grupo de 2500 mm³ (n= 3) (Figura 2.9). El tratamiento con PDF logró controlar el crecimiento tumoral con diferencias estadísticamente significativas en comparación con filanesib en monoterapia y con PD tras 5 y 10 días desde el inicio del tratamiento ($p < 0.05$).

Figura 2.9 Evolución del volumen tumoral del plasmocitoma subcutáneo en crecimiento exponencial desde el inicio del tratamiento.



Como se muestra en la Figura 2.10, esto se tradujo en una notable mejora en la mediana de supervivencia con una mediana de 14 días (rango, 11-7) y 18 días (rango, 18-25) para los grupos PD y F, respectivamente, que se prolongó hasta los 59 días (rango, 45-73) para los ratones tratados con PDF (Log-Rank test, $p < 0.05$ en todas las comparaciones). Es importante destacar que PDF fue capaz de prolongar la supervivencia de estos ratones, que estaban en un estado prácticamente terminal por su elevado volumen tumoral, hasta casi dos meses.

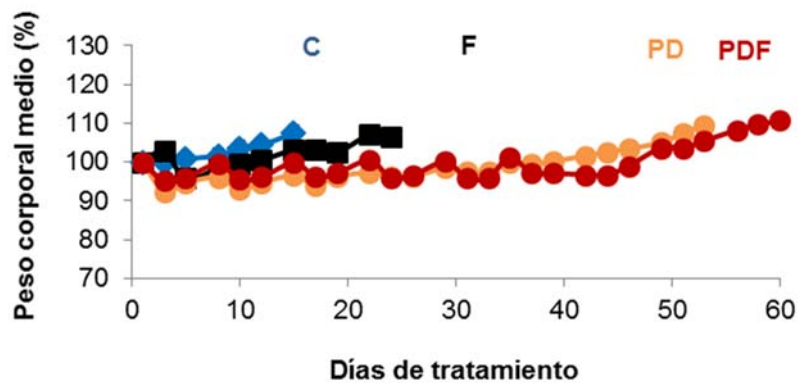
Figura 2.10 Supervivencia de los distintos grupos de tratamiento en ratones xenograft con tumores grandes, en fase de crecimiento exponencial, representada por curvas de Kaplan-Meier.



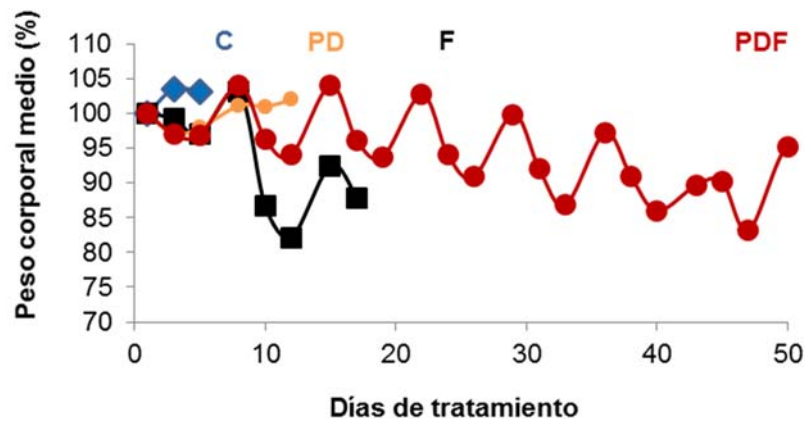
Con respecto a la toxicidad, la triple combinación PDF fue bien tolerada por los ratones desde el inicio del tratamiento, no siendo más tóxico que el de la terapia estándar PD (Figura 2.11). En ratones con plasmacitomas grandes, el tratamiento indujo una disminución moderada del peso corporal medio (sin alcanzar el 20%), que se recuperó en los días sin tratamiento, y que se debió en parte a la elevada carga tumoral.

Figura 2.11 Evolución del peso de los ratones de los distintos grupos de tratamiento que portan tumores pequeños (volumen tumoral medio de 125 mm³) y tumores grandes (volumen tumoral medio de 2500 mm³).

TUMORES DE PEQUEÑO TAMAÑO



TUMORES DE GRAN TAMAÑO

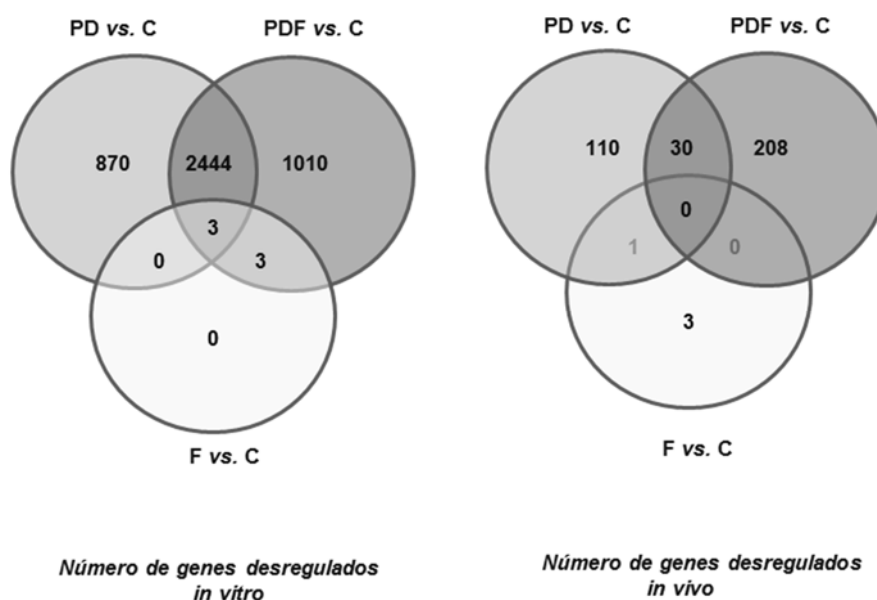


6. ANÁLISIS DEL EFECTO DE POMALIDOMIDA Y DEXAMETASONA EN COMBINACIÓN CON FILANESIB SOBRE EL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA.

Una vez demostrada la sinergia preclínica de la triple combinación en diferentes modelos *in vitro*, *ex vivo*, y particularmente, *in vivo*, se evaluó el mecanismo de acción de la misma. Para ello, se analizaron los cambios inducidos en el perfil de expresión génica de la línea celular MM.1S tras el tratamiento *in vitro* o en los tumores de los ratones tratados con PD, F y PDF en comparación con sus respectivos controles no tratados de tres experimentos independientes. En ambos estudios, el tratamiento con filanesib solo indujo una

mínima desregulación génica con respecto al control, con 6 y 4 genes significativamente desregulados en el estudio *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Sin embargo, el tratamiento con PDF mejoró el efecto del tratamiento estándar PD, particularmente en el estudio *in vivo*, siendo el número de genes desregulados para PDF vs. PD de 3460 vs. 3317 y 238 vs. 141 en los estudios *in vitro* e *in vivo*, respectivamente (Figura 2.12).

Figura 2.12 Diagrama de Venn del número de genes desregulados por cada tratamiento en comparación con sus respectivos controles en estudios *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.



Tras este análisis, se identificaron los 100 genes más significativamente desregulados (q -valor < 0.05) tras el tratamiento con PDF *in vitro* e *in vivo* respecto a los respectivos controles, y se analizó su *fold change* y si estaban sobreexpresados o infraexpresados (Anexo, tablas 1 y 2 de material suplementario). En las muestras *in vitro* la mayoría de genes estaban sobreexpresados (78 de 100). Sin embargo, en las muestras *in vivo*, algo menos de la mitad de genes estaban sobreexpresados (44 de 100). Dada la variedad de funciones en las que estos genes estaban involucrados en ambos estudios, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional con el fin de identificar los procesos biológicos que estaban significativamente alterados tras el tratamiento con PD, F y PDF. Así, en la Figura 2.13 se representan el número de procesos

biológicos alterados por cada tratamiento respecto del control en ambos estudios. A continuación, las tablas 2.3 y 2.4 detallan la naturaleza de los procesos biológicos más significativamente alterados tanto en los estudios *in vitro* (tabla 2.3) como *in vivo* (tabla 2.4). Como se puede observar en la Figura 2.13, tan solo en los estudios *in vitro* se identificaron tres procesos biológicos comunes a PD, F y PDF, y todos ellos estaban implicados en la mitosis y el ciclo celular (Tabla 2.3). Asimismo, y en ambos estudios, al analizar la función biológica de los más significativamente alterados solo con el tratamiento con PDF, se observó que muchos de ellos estaban implicados en diferentes etapas de la mitosis (los top 5 en el *in vitro* y 5 de los 17 desregulados tras el tratamiento en el ensayo *in vivo*) (ver Tablas 2.3 y 2.4).

Figura 2.13 Diagramas de Venn del número de procesos biológicos desregulados por cada tratamiento en comparación con sus respectivos controles en estudios *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

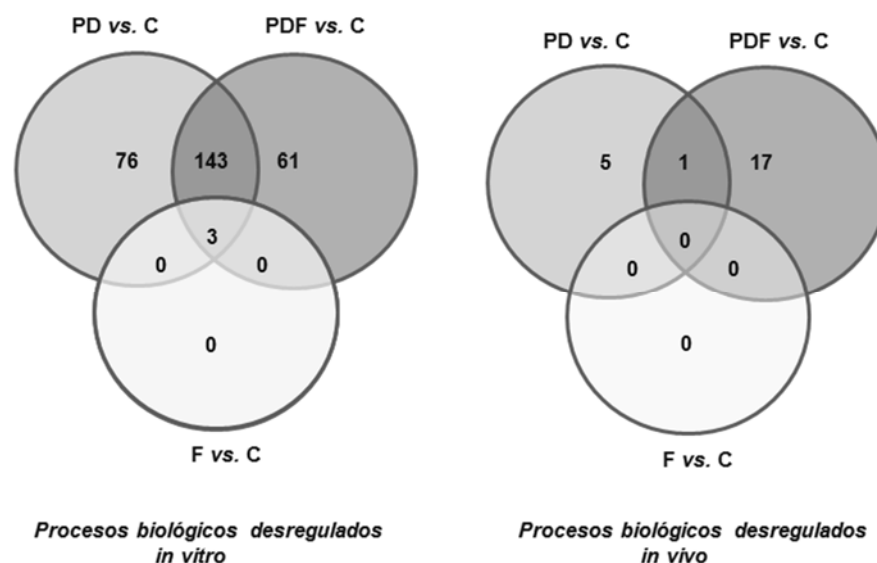


Tabla 2.3 Lista de las categorías ontológicas más importantes de los procesos biológicos alterados (nivel 5, en la clasificación de la base de datos Gene Ontology, GO) en células MM1.S tratadas con PD, F y PDF durante 24 horas, utilizando el análisis de enriquecimiento funcional DAVID. Se muestran las funciones de los procesos biológicos significativos, el *p* valor ajustado por Benjamini-Hochberg y la cantidad de

genes presentes en cada categoría. Los procesos biológicos relacionados con la mitosis están sombreados en gris.

| <i>In vitro</i> | PD | | F | | PDF | |
|--|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | <i>p</i> valor ajustado | Genes en la base de datos GO | <i>p</i> valor ajustado | Genes en la base de datos GO | <i>p</i> valor ajustado | Genes en la base de datos GO |
| <u>Procesos biológicos comunes para PD, F, y PDF</u> | | | | | | |
| Procesos mitóticos | 1.85E-19 | 258 | 3.55E+00 | 3 | 5.18E-27 | 283 |
| Transición del ciclo celular- mitosis | 5.29E-15 | 162 | 1.19E+00 | 3 | 1.59E-15 | 166 |
| Transición del ciclo celular | 1.35E-14 | 168 | 1.34E+00 | 3 | 4.80E-15 | 172 |
| <u>Procesos biológicos comunes para PD y PDF</u> | | | | | | |
| Procesos metabólicos ARN no codificante | 2.72E-30 | 211 | - | - | 3.45E-23 | 199 |
| Procesamiento del ARN | 8.19E-31 | 293 | - | - | 1.10E-21 | 274 |
| Procesamiento del ARNr | 9.22E-21 | 114 | - | - | 2.66E-19 | 113 |
| Replicación del ADN | 1.98E-24 | 126 | - | - | 6.87E-19 | 118 |
| Procesos metabólicos ADN | 4.04E-22 | 290 | - | - | 4.25E-15 | 273 |
| <u>Procesos biológicos exclusivos para PD</u> | | | | | | |
| Dirigidos a proteínas | 6.36E-03 | 162 | - | - | - | - |
| Control de la recombinación del ADN | 7.51E-03 | 26 | - | - | - | - |
| ARNm que se exporta del núcleo y unión a ribonucleoproteínas | 1.66E-02 | 36 | - | - | - | - |
| ARNm que se exporta desde el núcleo | 1.66E-02 | 36 | - | - | - | - |
| Control de la replicación del ADN | 1.96E-02 | 12 | - | - | - | - |
| <u>Procesos biológicos exclusivos para PDF</u> | | | | | | |
| Separación de cromátidas hermanas | - | - | - | - | 9.07E-06 | 53 |
| Separación de cromosomas | - | - | - | - | 2.43E-04 | 84 |
| Congresión en la placa metafásica | - | - | - | - | 7.02E-03 | 23 |
| Congresión en la placa metafásica-mitosis | - | - | - | - | 1.33E-02 | 19 |
| Localización de los cromosomas | - | - | - | - | 1.96E-02 | 28 |

Tabla 2.4 Lista de las categorías ontológicas más importantes de procesos biológicos alterados (nivel 5, en la clasificación GO) en células MM.1S obtenidas de plasmacitomas subcutáneos de ratones tratados durante 2 días con PD, F y PDF, utilizando el análisis de enriquecimiento funcional (DAVID). Se muestran las funciones de los procesos biológicos significativos, el *p* valor ajustado por Benjamini-Hochberg y la cantidad de genes presentes en cada categoría. Los procesos biológicos relacionados con la mitosis están sombreados en gris.

| <i>In vivo</i> | PD | | F | | PDF | |
|--|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | <i>p</i> valor ajustado | Genes en la base de datos GO | <i>p</i> valor ajustado | Genes en la base de datos GO | <i>p</i> valor ajustado | Genes en la base de datos GO |
| Procesos biológicos comunes para PD y PDF | | | | | | |
| Procesos de mitosis | 2.45E+00 | 13 | | | 3.34E-02 | 20 |
| Procesos biológicos exclusivos para PD | | | | | | |
| Transición de G ₁ /S a mitosis | 2.11E-03 | 8 | - | - | - | - |
| Regulación de la actividad peptidasa | 1.44E-02 | 9 | - | - | - | - |
| Integrinas y señalización celular | 3.23E-02 | 5 | - | - | - | - |
| Regulación de procesos metabólicos | 4.19E-02 | 23 | - | - | - | - |
| Regulación de proc. metabólicos-proteínas | 4.34E-02 | 24 | - | - | - | - |
| Procesos biológicos exclusivos para PDF | | | | | | |
| División nuclear | - | - | - | - | 4.02E-05 | 21 |
| Migración celular | - | - | - | - | 3.67E-03 | 27 |
| Biosíntesis de esteroides | - | - | - | - | 3.95E-03 | 6 |
| Procesos metabólicos-alcoholes | - | - | - | - | 4.17E-03 | 8 |
| Procesos metabólicos-esteroides | - | - | - | - | 6.80E-03 | 8 |
| División nuclear-mitosis | - | - | - | - | 9.05E-03 | 14 |
| Regulación del sistema nervioso | - | - | - | - | 9.91E-03 | 20 |
| Procesos de biosíntesis-alcoholes | - | - | - | - | 1.17E-02 | 7 |
| Transición-mitosis | - | - | - | - | 1.42E-02 | 15 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|----------|----|
| Desarrollo del sistema nervioso | - | - | - | - | 1.65E-02 | 39 |
| Desarrollo cerebral | - | - | - | - | 2.00E-02 | 18 |
| Procesos metabólicos-colesterol | - | - | - | - | 2.08E-02 | 7 |
| Regulación de la replicación viral génica | - | - | - | - | 2.40E-02 | 6 |
| Transición de fases del ciclo celular | - | - | - | - | 2.48E-02 | 15 |
| Regulación de la división nuclear | - | - | - | - | 2.56E-02 | 8 |
| Congresión en la placa metafásica | - | - | - | - | 2.73E-02 | 5 |
| Desarrollo órganos | - | - | - | - | 3.22E-02 | 50 |

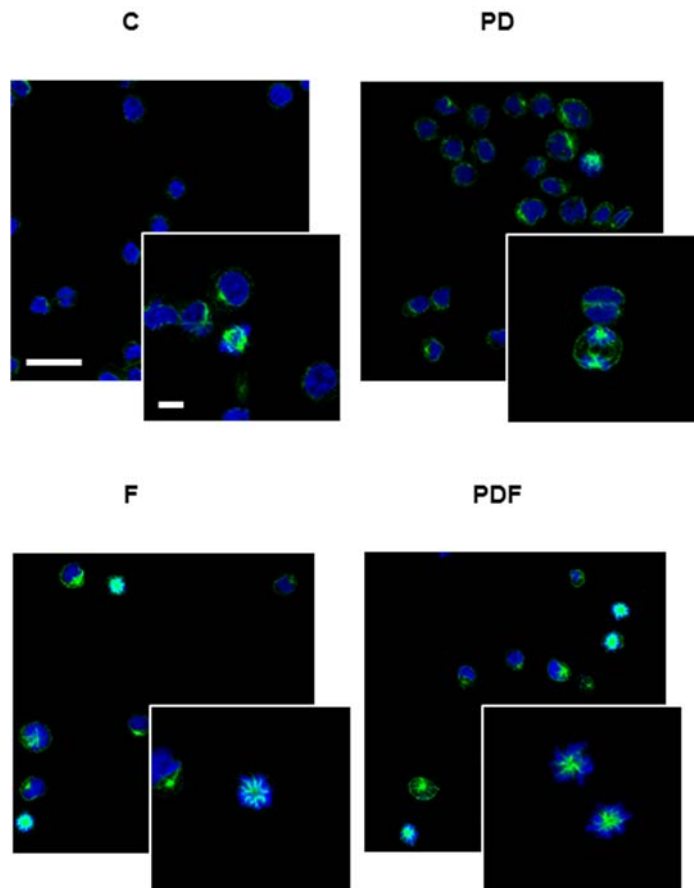
En base a estas observaciones, se analizaron todos los genes significativamente alterados (447 en total) tras el tratamiento con PDF *in vitro* que estaban implicados en mitosis y ciclo celular, analizando si estaban sobreexpresados o infraexpresados (Anexo, tabla 3 de material suplementario). Entre ellos, destacaron los genes CCNB1 y CCNB2, ambos significativamente sobreexpresados tras el tratamiento con PDF y que codifican las ciclinas B1 y B2, respectivamente, principales reguladoras de la transición de la fase G₂ a la fase M del ciclo celular. Asimismo, se identificaron otros dos genes sobreexpresados de manera significativa que podrían estar regulando la progresión del ciclo celular y la mitosis tras el tratamiento con PDF, PSMD3, que codifica la subunidad no-ATPasa 3 del proteasoma 26S, y NEK2, involucrado en la separación de los centrosomas. Además, otros dos genes mostraron una expresión incrementada en la combinación PDF; CDC25C y CDC25B, ambos necesarios para la entrada en mitosis.

7. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE POMALIDOMIDA Y DEXAMETASONA EN COMBINACIÓN CON FILANESIB PARA INHIBIR KSP EN CÉLULAS DE MM.

Un mecanismo que podría explicar la sinergia de la triple combinación podría ser la potenciación de la inhibición de KSP inducida por filanesib. Para confirmar esta hipótesis, se evaluó en la línea celular MM.1S la formación de husos monopolares aberrantes tras 24 horas de tratamiento con vehículo, F, PD o PDF. Mientras que la mayoría de las células control (tratadas con el vehículo),

y las expuestas a PD mostraron mitosis normales con husos bipolares típicos, casi todas las células tratadas con F y con PDF que estaban en mitosis mostraron un fenotipo aberrante con husos monopolares (Figura 2.14).

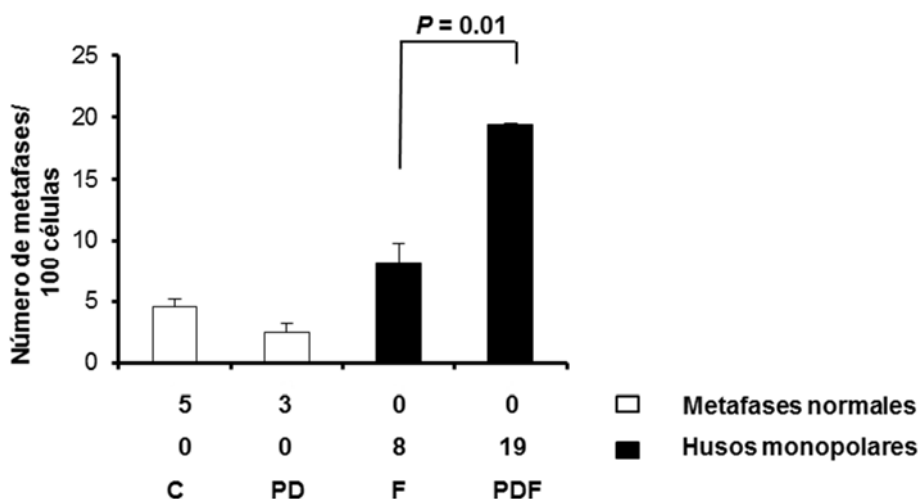
Figura 2.14 Estudio del fenotipo de células en metafase mediante el ensayo inmunocitoquímico con marcaje de ADN (DAPI= azul) y de α -tubulina (anti-tubulina=verde) tras 24 horas de tratamiento con vehículo, P= pomalidomida 500 nM, D= dexametasona 10 nM y F= filanesib 1 nM en células MM.1S. Barra = 15 μ m en la micrografía de mayor aumento; barra = 5 μ m en la de menor aumento). Imagen representativa de dos experimentos independientes.



Tras analizar las diferencias entre F y PDF, se observó que el tratamiento con la combinación triple aumentó el porcentaje de células en mitosis, que dio lugar a un aumento significativo en el número absoluto de husos monopolares, siendo 0, 0, 8 y 19 husos monopolares aberrantes por 100 células en metafase,

para el control, PD, F y PDF, respectivamente ($p=0.01$ para la comparación F vs. PDF) (Figura 2.15).

Figura 2.15 Cuantificación de la inducción de husos monopolares en células MM.1S tras 24 horas de tratamiento con vehículo o con PD, F o PDF. La significación estadística se evaluó con la prueba t de Student para dos experimentos independientes (P= pomalidomida, 500 nM; D= dexametasona, 10 nM; F= filanesib, 1 nM).



Estos resultados se confirmaron *in vivo* mediante inmunohistoquímica en tumores extraídos de ratones tras haber recibido tratamiento con las diferentes condiciones experimentales (Figura 2.16). Se demostró que en el control y en los ratones tratados con PD las mitosis fueron normales. Sin embargo, el tratamiento con F y PDF indujo un promedio de 6 y 11 husos monopolares por campo, siendo, de nuevo, significativamente mayor en la triple combinación ($p= 0.008$) (Figura 2.17).

Figura 2.16 Evaluación de husos monopolares en secciones de parafina de tumores de células MM.1S tras tratamiento con vehículo (control = C), PD, F o PDF durante dos días y teñidos con hematoxilina y eosina (H & E). Los husos monopolares se caracterizaron por cromosomas teñidos con hematoxilina (en morado) orientados conformando un anillo. (Barra = 10 μ m). Imagen representativa de tres experimentos independientes.

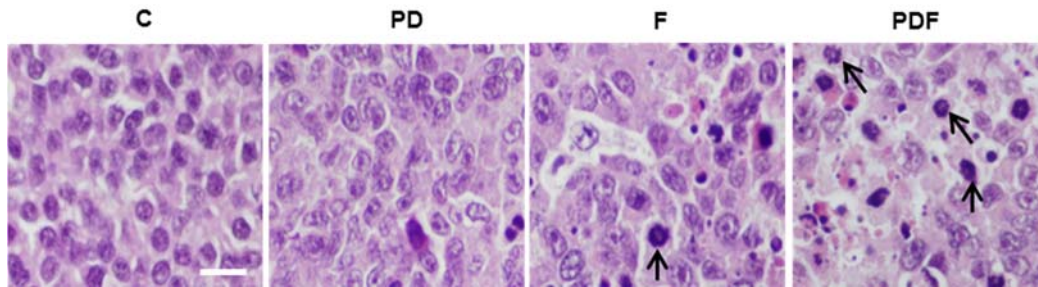
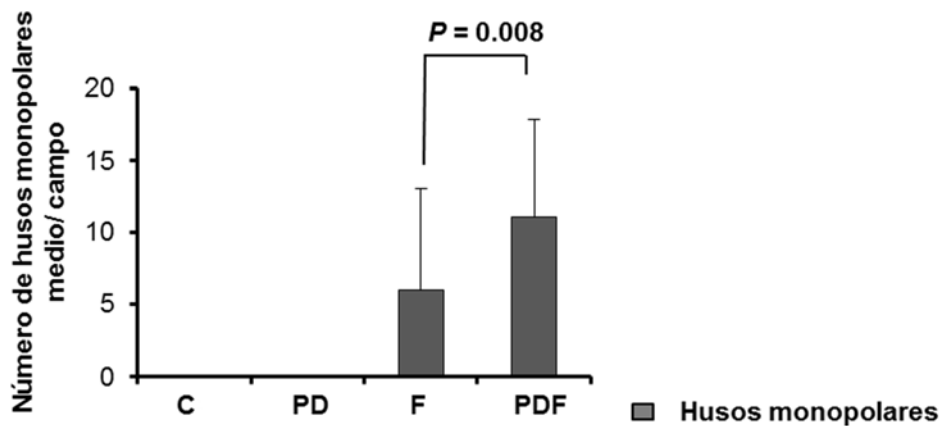


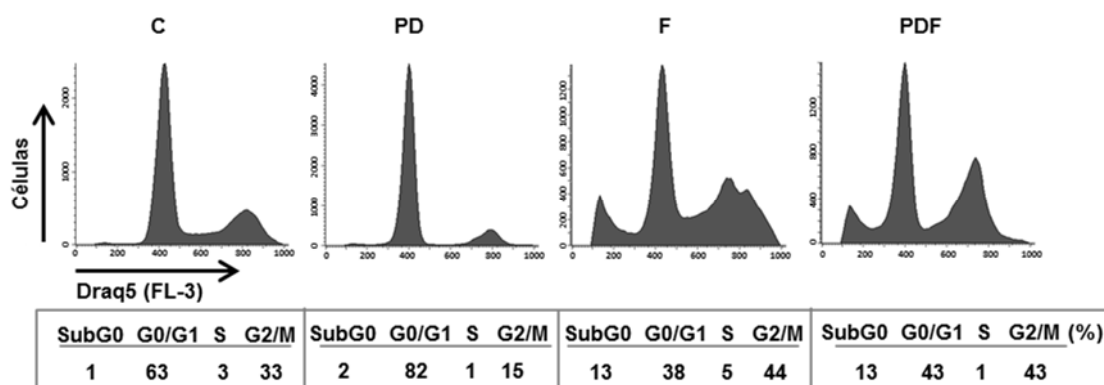
Figura 2.17 Cuantificación de husos monopolares en secciones de parafina de tumores de la línea celular MM.1S tras tratamiento con vehículo (control = C), PD, F o PDF durante dos días y teñidos con hematoxilina y eosina (H & E). Treinta campos de gran aumento (600x) fueron evaluados para cada condición experimental (3 ratones por condición). Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar. La significación estadística se evaluó con la prueba t de Student.



8. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE POMALIDOMIDA Y DEXAMETASONA EN COMBINACIÓN CON FILANESIB EN EL CICLO CELULAR Y EN LA INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS.

A continuación, se evaluó el efecto específico de PDF sobre el perfil del ciclo celular (Figura 2.18). Para ello, en primer lugar, se trataron células MM.1S con los diferentes tratamientos PD, F y PDF durante 48 horas y se cuantificó el número de células en cada fase del ciclo celular por marcaje del ADN con DRAQ5 por citometría de flujo. Mientras que PD no mostró ningún efecto relevante, el tratamiento con filanesib en monoterapia detuvo significativamente a las células en fases proliferativas, con un 49% de células en S y G₂/M frente a solo un 36% de células en el control ($p=0.03$ obtenida por la prueba t de Student para tres experimentos independientes). De igual forma, la combinación triple PDF mostró resultados similares en comparación con F, con un 44% de células en G₂/M.

Figura 2.18 Análisis del ciclo celular por marcaje del ADN con Draq5 en células MM.1S sin y con tratamiento con PD, F o PDF durante 48 horas. (P=pomalidomida, 500 nM, D= dexametasona, 10 nM y F= filanesib, 1 nM). Imagen representativa de dos experimentos independientes.



Para verificar si había una susceptibilidad particular a la apoptosis en alguna de las fases del ciclo celular con el tratamiento con PDF, se realizó una tinción simultánea con DRAQ5 (que al ser altamente lipofílico marca igualmente el contenido del ADN de células vivas y muertas) y Anexina V y se analizó por citometría de flujo el porcentaje de células muertas por apoptosis en cada fase

del ciclo celular (Figura 2.18). Como era de esperar, se observó que con el tratamiento con F había más células apoptóticas en fases proliferativas, en concreto el 58% del total de células paradas en G₂/M eran Anexina V+ frente a un 33% de células en fases no proliferativas (Figuras 2.19 y 2.20). En la misma línea, la triple combinación PDF indujo significativamente más apoptosis en las células en fases proliferativas, ya que el 88% de ellas estaban en apoptosis.

Figura 2.19 Análisis simultáneo del ciclo celular y la inducción de la apoptosis en células MM.1S sin y con tratamiento con pomalidomida 500 nM (P), dexametasona 10 nM (D) y filanesib a 1 nM (F) durante 48 horas, mediante citometría de flujo tras doble marcaje con Draq5 / Anexina V. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

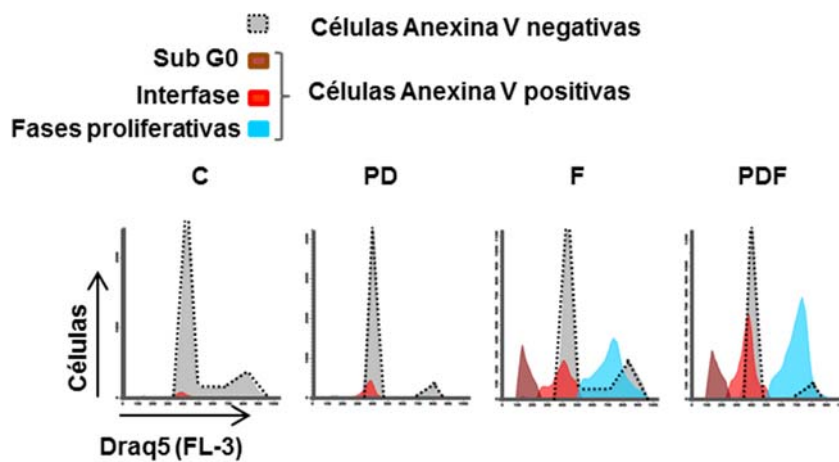
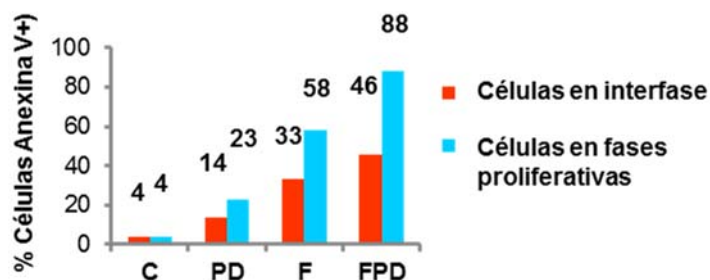


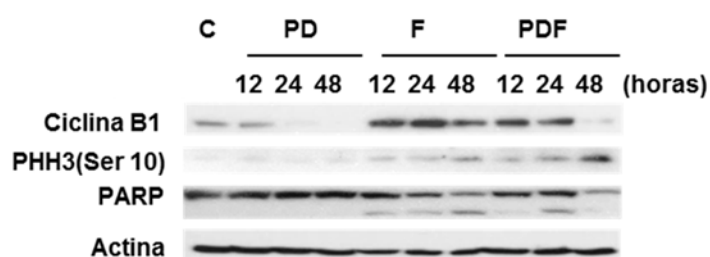
Figura 2.20 Análisis del porcentaje de células apoptóticas en cada fase del ciclo celular obtenido de experimento representado en la figura anterior. Imagen representativa de dos experimentos independientes.



Para confirmar estos resultados y comprender mejor el mecanismo de la combinación PDF, se incubaron células MM.1S con los diferentes tratamientos durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se lisaron y se recogieron los extractos celulares para analizar los niveles de algunas de las proteínas más importantes que regulan o participan en G_2/M , así como, proteínas implicadas en la apoptosis (Figura 2.21). En primer lugar, se analizaron los niveles de ciclina B1 (cuyo gen estaba sobreexpresado por GEP tras tratamiento con PDF). Esta proteína es una de las principales reguladoras del paso de la fase G_2 del ciclo celular a la mitosis, esencial para activar a la CDK1 y la fosforilación de múltiples sustratos necesarios para los primeros estadios de la mitosis; como son la condensación de los cromosomas, la rotura de la membrana nuclear y la formación del huso mitótico. Acorde con el porcentaje de células detenidas en fases G_2/M observado por citometría de flujo, se observó un aumento en los niveles de ciclina B1 tras 12 y 24 horas de tratamiento con F y con PDF. Sin embargo, y a diferencia de lo observado con F, tras 48 horas de tratamiento con PDF los niveles de esta proteína disminuyeron drásticamente, algo que sucede cuando se activa el complejo promotor de la anafase (APC/C) encargado de degradar a esta proteína en las últimas fases de la mitosis ²²¹. Al analizar por western blot los niveles de la proteína histona H3 fosforilada (pHH3) (marcador de células en mitosis), se observó que tras 48 horas de tratamiento con PDF,

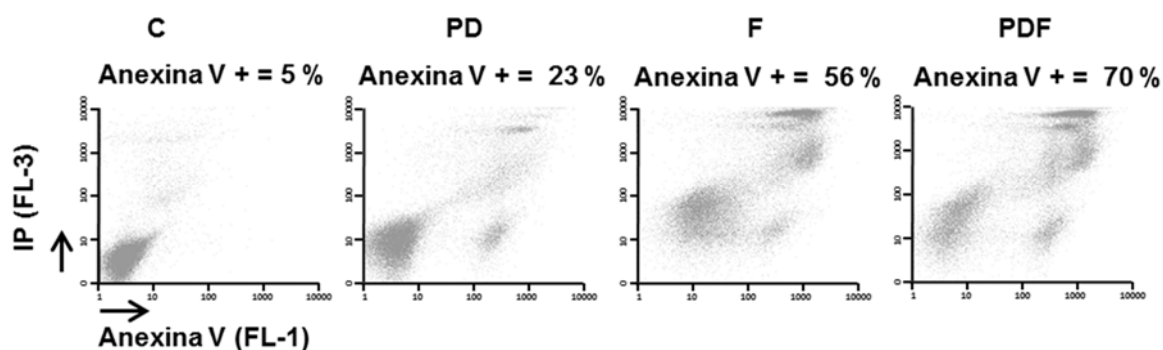
aumentaban los niveles de esta proteína, indicando que, a pesar de que la ciclina B1 disminuye drásticamente, las células se estaban acumulando en mitosis. A su vez se observó degradación de PARP en estas células (suceso que acontece en fases finales de la apoptosis), indicando que las células acumuladas en mitosis morían por apoptosis.

Figura 2.21 Análisis mediante Western blot de los niveles de ciclina B1, de la histona H3 fosforilada (pHH3) y de PARP en células MM.1S sin y con tratamiento a tiempos crecientes. Imagen representativa de dos experimentos independientes.



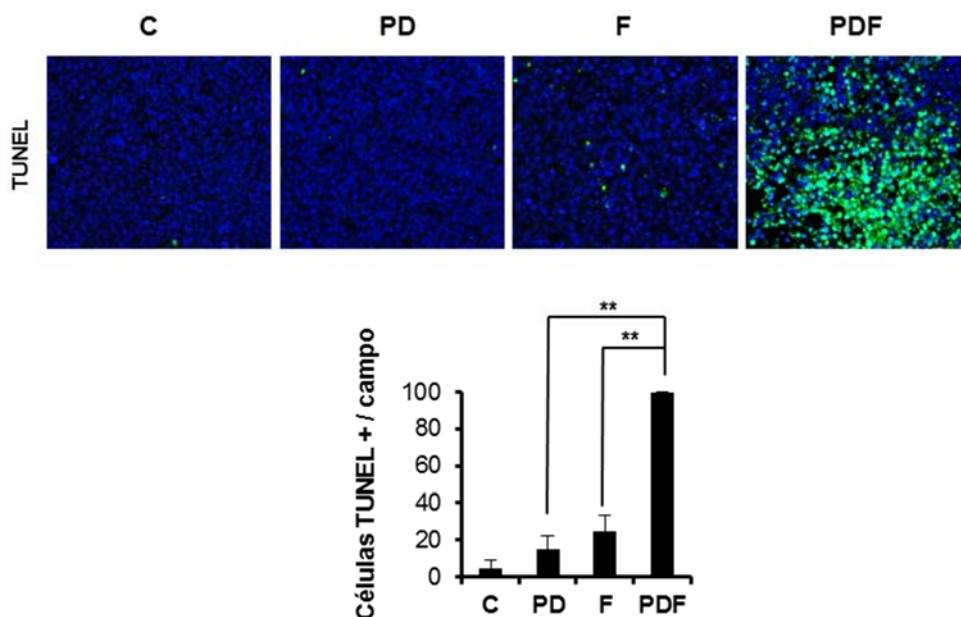
La inducción de la apoptosis tras el tratamiento con PDF, se demostró también mediante citometría de flujo por doble marcaje con Anexina V/ Ioduro de propidio (IP) (Figura 2.22). Se observó que el tratamiento de células MM.1S con PD y F aumentó el número de células Anexina V positivas apoptóticas, de un 5 % en el control a un 23 y un 56 % con PD y F, respectivamente. Este efecto fue mucho mayor tras el tratamiento con PDF, con un 70 % de células Anexina V positivas.

Figura 2.22 Análisis de la inducción de la apoptosis en células MM.1S con los diferentes tratamientos durante 48 horas mediante citometría de flujo con doble marcaje con Anexina V /Ioduro de propidio. Imagen representativa de dos experimentos independientes.



Asimismo, el ensayo TUNEL realizado en los tumores de los ratones tratados con PDF mostró un aumento significativo de células apoptóticas al comparar con F ($p < 0.01$) o con PD ($p < 0.01$) (Figura 2.23).

Figura 2.23 Microfotografías de las secciones de los plasmacitomas de células MM.1S procedentes de ratones tratados durante 2 días con C, PD, F o PDF y teñidos mediante el ensayo inmunohistoquímica TUNEL. A su vez se muestra la cuantificación de células TUNEL positivas (en verde) analizadas en treinta campos de gran aumento (630x) para cada condición experimental, tres ratones por condición. Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar; ** $P < 0.01$ calculada por el test t de Student.



9. ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA PROAPOPTÓTICA BAX Y DE LA ANTIAPOPTÓTICA MCL-1 EN LA EFICACIA DE POMALIDOMIDA Y DEXAMETASONA EN COMBINACIÓN CON FILANESIB.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de acción responsable del incremento de la respuesta apoptótica en las células tratadas con PDF, se analizaron dos moléculas claves en la respuesta a filanesib implicadas en este proceso: la proteína proapoptótica Bax (propuesta en el capítulo 1) y la proteína antiapoptótica Mcl-1. Para ello, se analizaron por western blot los niveles totales de estas proteínas en la línea celular MM.1S tras 48 horas tras tratamiento con PD, F y PDF (Figura 2.24). Curiosamente, y a diferencia de lo observado en F, los niveles de Mcl-1 no se vieron afectados significativamente después del tratamiento con PDF. Por el contrario, dos eventos fueron claramente potenciados en la triple combinación en comparación con filanesib en monoterapia: primero, PDF indujo un aumento en la expresión de los niveles totales de Bax *in vitro* (Figura 2.24), y segundo, PDF incrementó la localización subcelular de esta proteína en la mitocondria, donde ejerce su actividad proapoptótica (Figura 2.24). Este evento condujo a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, que se manifestó con la liberación al citosol del factor apoptogénico citocromo-C (Figura 2.25).

Figura 2.24 Análisis por western blot de los niveles basales de Mcl-1 y de Bax en la línea celular MM.1S tras diferentes tratamientos a tiempos crecientes (P=pomalidomida 500 nM, D=dexametasona 10 nM y F=filanesib). Imagen representativa de dos experimentos independientes.

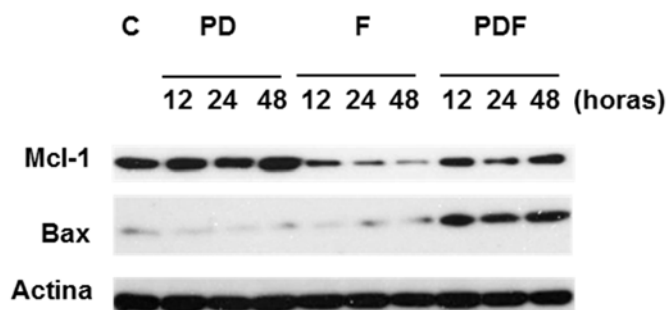
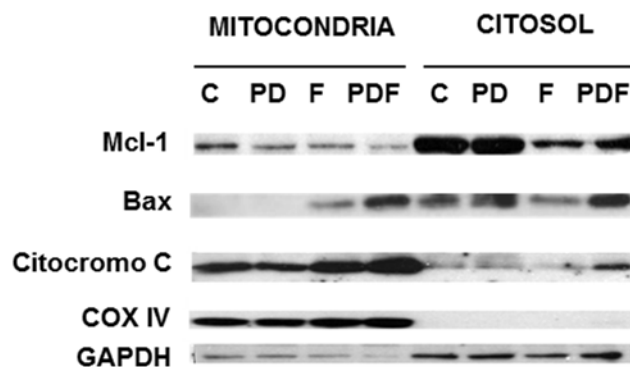
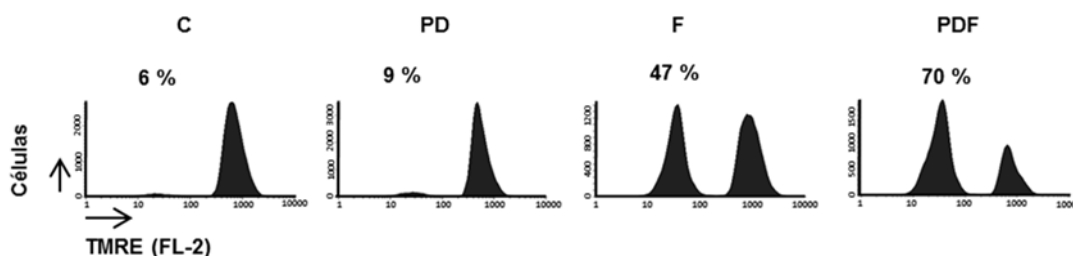


Figura 2.25 Análisis de la expresión de las proteínas Mcl-1 y Bax en la mitocondria y en el citosol de la línea celular MM.1S sin y con los distintos tratamientos durante 48 horas (P=pomalidomida 500 nM, D=dexametasona 10 nM y F=filanesib). Imagen representativa de dos experimentos independientes.



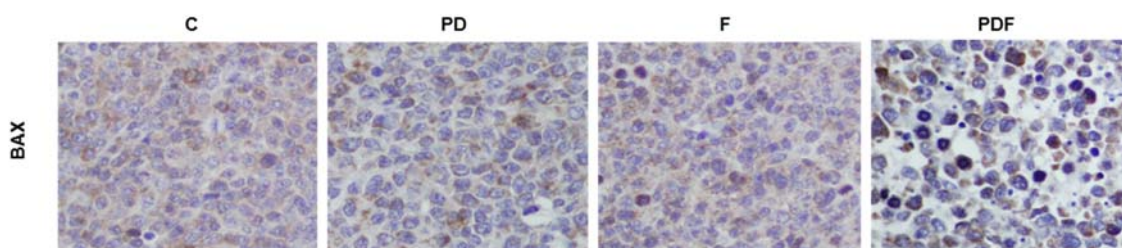
Asociado a esto se observó una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, como se observó por citometría de flujo con el éster etílico, tetrametilrodamina (TMRE, Figura 2.26).

Figura 2.26 Evaluación de cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células MM.1S con y sin tratamiento durante 48 horas (P=pomalidomida 500 nM, D=dexametasona 10 nM y F=filanesib). Imagen representativa de dos experimentos independientes.



Asimismo, en las tinciones inmunohistoquímicas de plasmocitomas subcutáneos de ratones tratados con PDF, se observó que el tratamiento con PDF indujo una mayor expresión de la proteína Bax (Figura 2.27).

Figura 2.27 Análisis inmunohistoquímico de la expresión proteica de Bax en secciones de parafina de tumores de células MM.1S procedentes de ratones tratados con vehículo (control = C), PD, F o PDF durante dos días (Barra= 20 μ M). Imagen representativa de tres experimentos independientes.



10. ANÁLISIS PRECLÍNICO DE POMALIDOMIDA Y DEXAMETASONA EN COMBINACIÓN CON FILANESIB EN EL MIELOMA MÚLTIPLE. DISCUSIÓN.

En el presente capítulo, se ha evaluado preclínicamente la combinación de varios IMiD junto con dexametasona y filanesib. Este nuevo agente terapéutico ya ha demostrado eficacia con dexametasona y se ha testado en combinación con inhibidores del proteasoma en pacientes con MM refractario o

en recaída. Datos preliminares ya habían demostrado la existencia de un efecto altamente sinérgico cuando se combina filanesib con pomalidomida en ratones con xenoinjertos de tres líneas celulares de MM (RPMI-8226, JLN3 y H929), donde, varios ratones alcanzaron una respuesta clínica completa mantenida en dos de los tres modelos de MM ²¹⁹. Nuestros resultados *in vitro*, *ex vivo* y, notablemente, *in vivo* claramente confirman la sinergia entre filanesib y pomalidomida y evidencian el beneficio de la asociación de dexametasona. Este efecto sinérgico se confirmó en varias líneas celulares de MM, en células de pacientes y en presencia de citoquinas o células estromales remodelando el microambiente medular. Asimismo, en los ensayos *in vitro* de citotoxicidad y sobre todo en el modelo de xenoinjerto subcutáneo con células MM.1S, se demostró que los tres IMiD (talidomida, lenalidomida y pomalidomida) en combinación con dexametasona, potenciaron la actividad de filanesib, siendo la combinación con pomalidomida y dexametasona la que mostró mayor eficacia.

Dado que el filanesib es un fármaco antimitótico, es razonable pensar que podría ser particularmente efectivo en células altamente proliferativas. De acuerdo con esto, el efecto *in vivo* de la triple combinación fue particularmente potente en ratones que portaban tumores grandes, cuyo crecimiento es exponencial. Además, esta combinación prolongó la supervivencia de los ratones hasta casi dos meses. El análisis del perfil de expresión génica de las células de MM cultivadas *in vitro* y de los tumores de los ratones tratados con PDF mostraron un gran número de genes sobre expresados que participan en la separación de los centrosomas (NEK2), en el checkpoint de la mitosis (CCNB1, CCNB2) y en la entrada mitosis (CDC25 C y CDC25 B), lo que indica que la combinación triple altera significativamente procesos mitóticos. Parcialmente explicando este hecho, datos previos han demostrado que los centrosomas se separan más rápido cuando existe sobreexpresión de CCNB2 ²²².

En base a estos datos, el efecto anti-mieloma de PDF podría deberse a un aumento de células en mitosis y, a su vez, a una mayor formación de husos monopolares. Para confirmar esta hipótesis, se evaluó por inmunohistoquímica el fenotipo de las células en metafase. Efectivamente, la triple combinación indujo un aumento en la formación de husos monopolares aberrantes en

comparación con filanesib en monoterapia. En consonancia, se demostró que el tratamiento con PDF, al igual que el tratamiento con filanesib, indujo el mismo porcentaje de células paradas en G₂/M, aunque la triple combinación indujo un aumento substancial de la apoptosis en este grupo de células.

En el capítulo anterior se demostró que la proteína proapoptótica Bax es crucial para desencadenar la muerte inducida por filanesib en células de MM. En la misma línea, el tratamiento con PDF induce una mayor expresión de esta proteína, así como su activación, y esto explica el aumento de la apoptosis en células proliferativas. Además, posiblemente debido a que Bax induce la permeabilización de la membrana mitocondrial, se observa una mayor liberación del citocromo-C al espacio citosólico donde puede ejercer su actividad apoptogénica. Estos experimentos sugieren que los niveles de expresión y la activación de Bax son cruciales para determinar destino de las células MM tratadas con PDF.

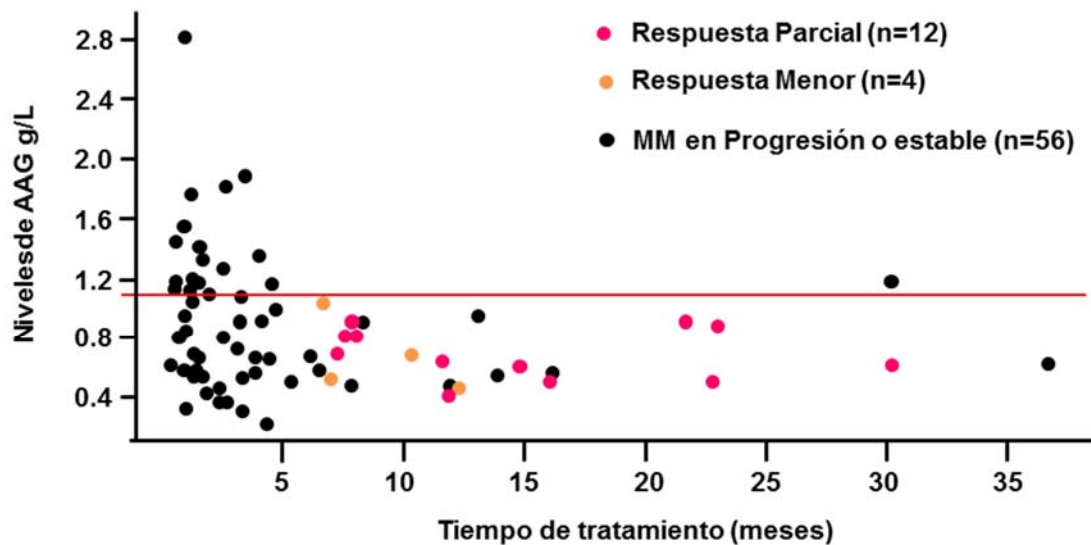
En conclusión, estos estudios preclínicos demuestran la sinergia de la triple combinación PDF *in vitro* y especialmente *in vivo*. La eficacia de esta combinación se basa en la inducción de la formación de husos monopolares y bloqueo de células en mitosis, así como, en la inducción de la apoptosis de las células bloqueadas en mitosis caracterizada por el aumento de la expresión y activación de Bax, siendo esta proteína un posible biomarcador predictivo de la respuesta a PDF en MM. Estos resultados apoyan el ensayo clínico de fase II POMDEFIL, que actualmente está realizando el Grupo de MM español para evaluar esta combinación en pacientes con MM refractario ²²⁰.

CAPÍTULO III. EVALUACIÓN PRECLÍNICA DEL REACTANTE DE FASE AGUDA ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA HUMANA (AAG) COMO POSIBLE BIOMARCADOR DE RESPUESTA EN EL MIELOMA MÚLTIPLE

Algunas proteínas del suero humano tienen la capacidad de unirse a drogas y de alterar su eficacia clínica. Entre ellas, la alfa-1 glicoproteína ácida (AAG), es una de las más conocidas ²²³⁻²²⁵. Se trata de un reactante de fase aguda que puede aparecer elevado en el plasma de pacientes con cáncer ^{226, 227}, incluido el MM ²²⁸. Así, la AAG se ha presentado recientemente como un potencial biomarcador de respuesta al inhibidor de la kinesin spindle protein (KSP) filanesib ^{167, 168, 229}.

En un estudio retrospectivo presentado en el congreso americano de hematología en el año 2013 se analizó la relación entre los niveles plasmáticos de AAG en pacientes con MM refractario o en recaída tratados con filanesib y la respuesta al tratamiento, indicando que los pacientes con altos niveles de AAG no respondían al tratamiento con este fármaco en monoterapia y tampoco en combinación con dexametasona ¹⁶⁷. En la figura 3.1 se representan los niveles plasmáticos de AAG de 72 pacientes con MM y sus respuestas a lo largo del tratamiento. Como se puede comprobar, únicamente los pacientes con niveles plasmáticos de AAG por debajo de la línea de corte calculada mediante el método de Youden ^{230, 231} y representada en rojo (1.1g/L de AAG) responden al tratamiento. Además, estos pacientes son los que disfrutaban de un mayor tiempo en tratamiento.

Figura 3.1 Análisis de respuesta en 72 pacientes con MM refractario o en recaída según sus niveles plasmáticos de AAG tratados con filanesib en monoterapia o en combinación con dexametasona. Bajos niveles de AAG \leq 1.1 g/l; Altos niveles de AAG $>$ 1.1 g/l.



Tunquist BJ. et al, ASH 2013

Esto se tradujo en que en el conjunto de pacientes tratados tanto con filanesib en monoterapia (F) como en combinación con dexametasona (FD), el subgrupo de pacientes con bajos niveles plasmáticos de AAG presentó una mayor supervivencia libre de progresión (SLP) (1.7 y 4.2 meses vs 1.6 y 2.8 meses para F y FD, en pacientes con bajos niveles de AAG vs el total de pacientes) y supervivencia global (OS) que (19.1 y 10.8 vs 19.0 y 10.7) ¹⁶⁸.

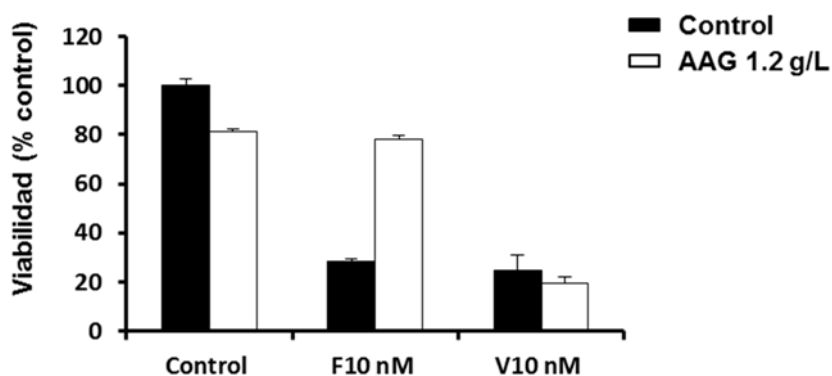
Con respecto a los mecanismos responsables, al analizar la capacidad de unión de la AAG a filanesib *in vitro*, se observó que esta proteína presentaba una elevada afinidad por filanesib con una constante de disociación en equilibrio (Kd) en el rango μM , muy superior a la mostrada por la albúmina de suero humano (ASH) ¹⁶⁷, la proteína plasmática más abundante y con mayor capacidad de fijación a fármacos. Además, se identificó que los pacientes que presentaban altos niveles de AAG y que no respondían al tratamiento mostraban alteraciones en la distribución del fármaco en el organismo, estando este menos disponible en los tejidos debido a la disminución de su fracción libre, no unida a la proteína AAG. Estos datos indicaron que esta interacción podría ocasionar la unión y subsiguiente secuestro de filanesib por la proteína AAG. Sin embargo, se desconoce si altos niveles de AAG podrían también activar, por otros

mecanismos, rutas de resistencia en la célula tumoral mielomatosa que expliquen la ausencia de actividad de este u otros fármacos anti-mieloma.

1. ANÁLISIS DE LA EFICACIA PRECLÍNICA DE FILANESIB EN PRESENCIA DE AAG.

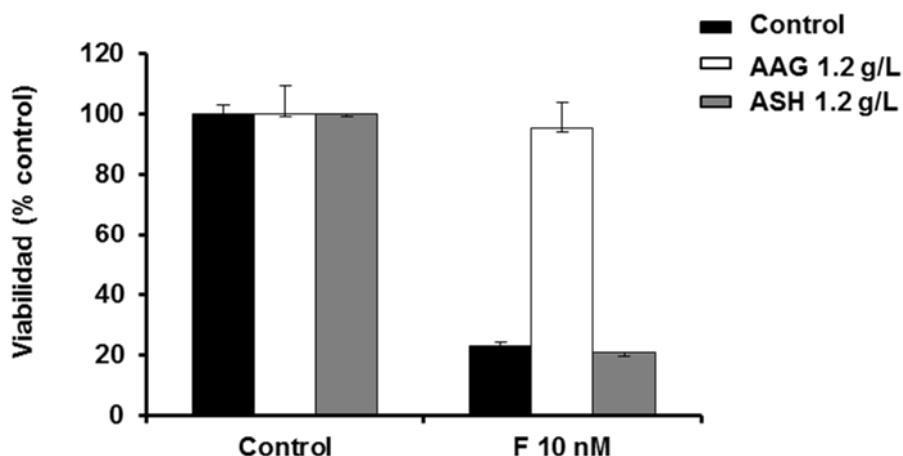
Inicialmente se comprobó el efecto *in vitro* de AAG sobre la eficacia de filanesib. Se trataron células MM.1S con concentraciones relevantes de filanesib (F) a 10 nM en ausencia y en presencia de altas concentraciones de esta proteína plasmática (1.2 g/L) durante 48 horas, midiéndose posteriormente la viabilidad de las células por la técnica colorimétrica del MTT. Se utilizó como control negativo a la vincristina (V), otro fármaco antimitótico que se sabe no interacciona con la AAG ²³² (Figura 3.2). Se observó que, la presencia de AAG sola tenía un mínimo efecto sobre la viabilidad celular con una reducción de la viabilidad de un 19%. El tratamiento con filanesib indujo un 71% de muerte que se redujo drásticamente (21%) en presencia de AAG. Además, y acorde con lo esperado, se observó que la eficacia de vincristina no se veía alterada significativamente en presencia de AAG, siendo la viabilidad celular sin AAG de 24.8% frente a un 19.4 % en presencia de AAG.

Figura 3.2 Evaluación de la eficacia preclínica de los fármacos antimitóticos filanesib (F) y vincristina (V) a 10 nM en ausencia o en presencia de 1.2 g/L de AAG a 48 horas en la línea celular MM.1S. (C=control sin tratamiento; F= filanesib; V= vincristina). Gráfico representativo de dos experimentos independientes.



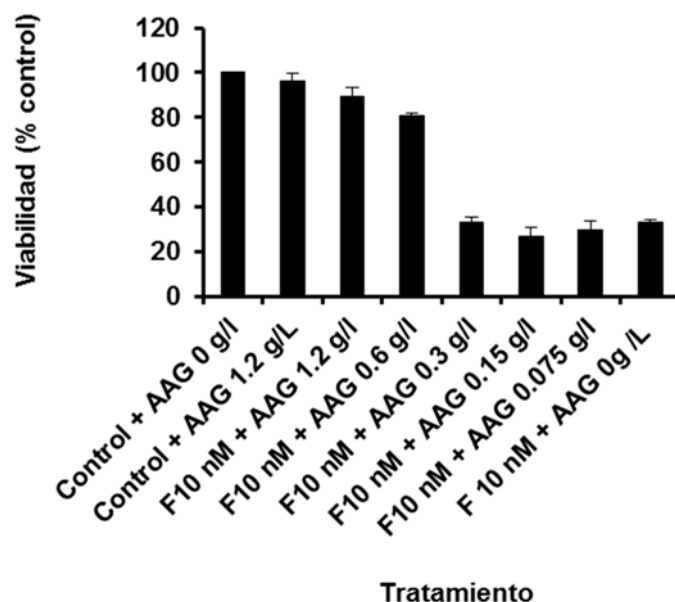
Para evaluar si el efecto observado es específico de AAG o es debido a una elevada concentración de proteínas en el medio de cultivo celular, se trataron células MM.1S con filanesib a 10 nM en ausencia o en presencia de AAG o de albúmina de suero humano (ASH), ambas proteínas a la misma concentración de 1.2 g/L, durante 48 horas y se midió la citotoxicidad celular por MTT (figura 3.3). Mientras que la presencia de AAG inhibió casi completamente la eficacia de filanesib, el tratamiento con ASH no afectó al efecto citotóxico de filanesib, siendo la viabilidad celular sin ASH del 22.8% y con ASH del 20.7 %, indicando que no es un mecanismo general sino específico de la proteína plasmática AAG.

Figura 3.3 Evaluación de la eficacia preclínica de filanesib en ausencia o en presencia de 1.2 g/L de AAG o de ASH a 48 horas en la línea celular MM.1S. (C=control sin tratamiento; F= filanesib). Gráfico representativo de dos experimentos independientes.



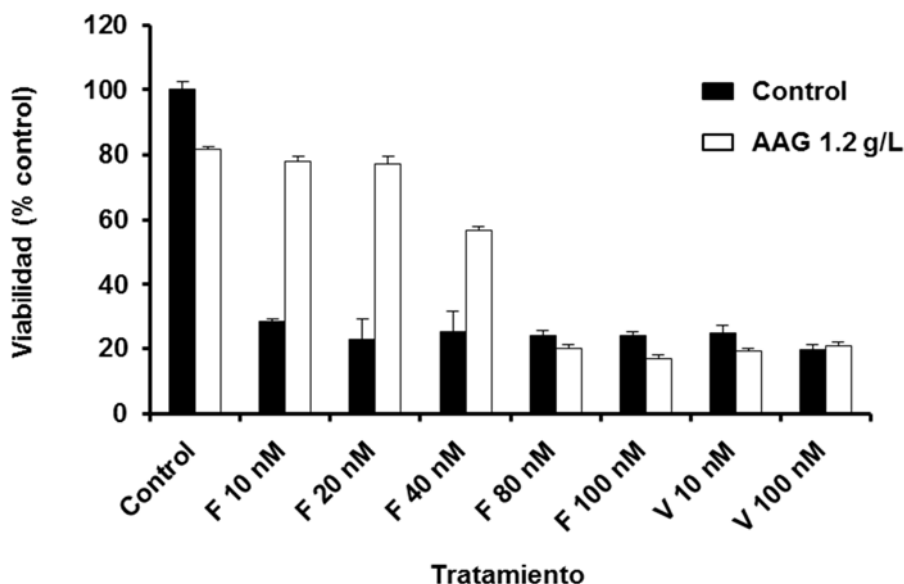
Una vez demostrado que la proteína AAG inhibe de una manera específica la eficacia *in vitro* de filanesib, se analizó si esta interacción era dependiente de la concentración de AAG, para ello, se trataron células MM.1S durante 48 horas con filanesib a 10 nM y con dosis crecientes de AAG (0-1.2 g/L) y se midió la viabilidad celular por la técnica de MTT. Acorde con lo observado en clínica, se confirmó que la inhibición de la eficacia *in vitro* de filanesib era dependiente de la concentración de AAG; a bajas concentraciones la proteína AAG no afectó a la eficacia de filanesib y a partir de 0,6 g/L se inhibió casi completamente la eficacia del fármaco (Figura 3.4).

Figura 3.4 Evaluación de la eficacia preclínica de 48 horas de tratamiento con filanesib (F) a 10 nM en la línea celular MM.1S en presencia de dosis crecientes de AAG. Gráfico representativo de dos experimentos independientes.



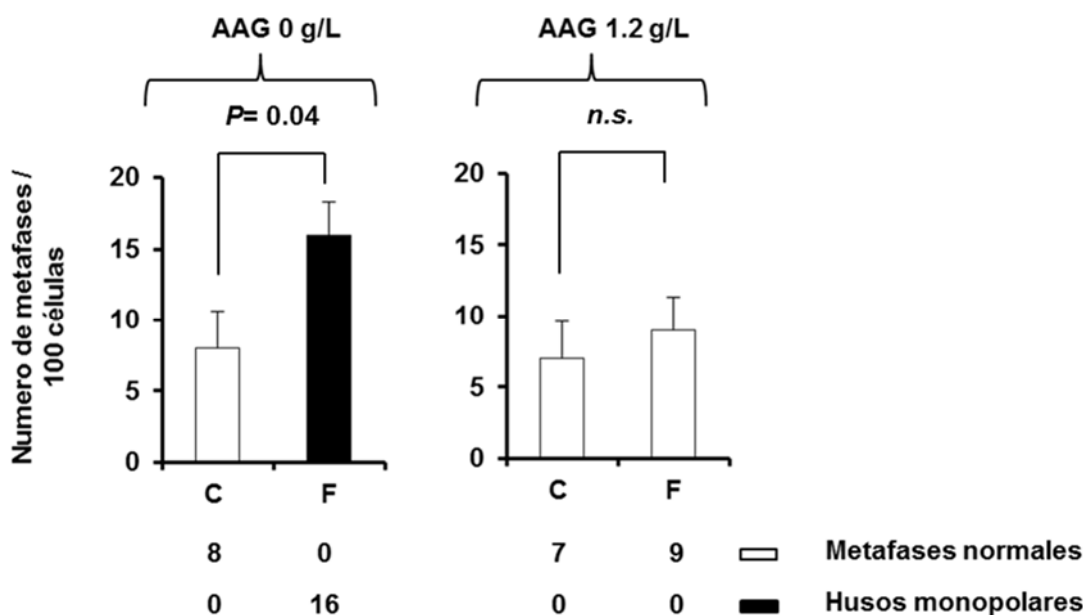
Para comprobar si la inhibición de la eficacia de filanesib por AAG es revertida al aumentar la concentración de filanesib, se evaluó la viabilidad de las células MM.1S en presencia de una concentración constante de AAG 1.2 g/L y concentraciones crecientes de filanesib. Se observó que al aumentar cuatro veces la concentración de filanesib el efecto inhibitor de la AAG comenzaba a revertirse y al aumentar ocho veces su concentración se anulaba completamente el efecto de AAG, indicando que la interacción de AAG con filanesib es un fenómeno saturable (Figura 3.5) dependiente de la concentración de proteína y de fármaco y probablemente debido a la existencia de un número finito de sitios de unión en la proteína AAG.

Figura 3.5 Evaluación de la eficacia preclínica de filanesib (F) a dosis crecientes en ausencia o en presencia de 1.2 g/L de AAG a 48 horas en la línea celular MM.1S. Gráfico representativo de dos experimentos independientes.



La ausencia de eficacia de filanesib en presencia de altas concentraciones de AAG se confirmó al analizar su naturaleza inhibidora de la KSP a través de la cuantificación de la formación de husos monopulares. Así, se trataron células MM.1S con filanesib a 10 nM durante 24 horas en presencia y ausencia de AAG a 1.2 g/L y se analizó el fenotipo de los husos mitóticos de la línea celular MM.1S en metafase por microscopía confocal por doble marcaje con DAPI y α -tubulina y se cuantificó con el microscopio de fluorescencia el número de células en metafase por campo y se analizó si el fenotipo de las mismas era mono- o bipolar (Figura 3.6). Acorde con lo esperado, se observó que el tratamiento con filanesib, aumentó de forma significativa las células en metafase con respecto al control y que todas ellas eran aberrantes, con husos monopulares. Sin embargo, en las células que recibieron conjuntamente altas concentraciones de AAG y filanesib, la KSP funcionaba correctamente presentando metafases con husos bipolares normales.

Figura 3.6 Estudio de la capacidad de inhibición de KSP mediante cuantificación de la formación de husos monopolares tras tratamiento con filanesib (F) a 10 nM en ausencia o en presencia de 1.2 g/L de AAG durante 24 horas en la línea celular MM.1S (C= control; F= filanesib). La significación estadística se evaluó con la prueba t de Student para dos experimentos independientes ($P= P$ -valor; *n.s* = no significativo).

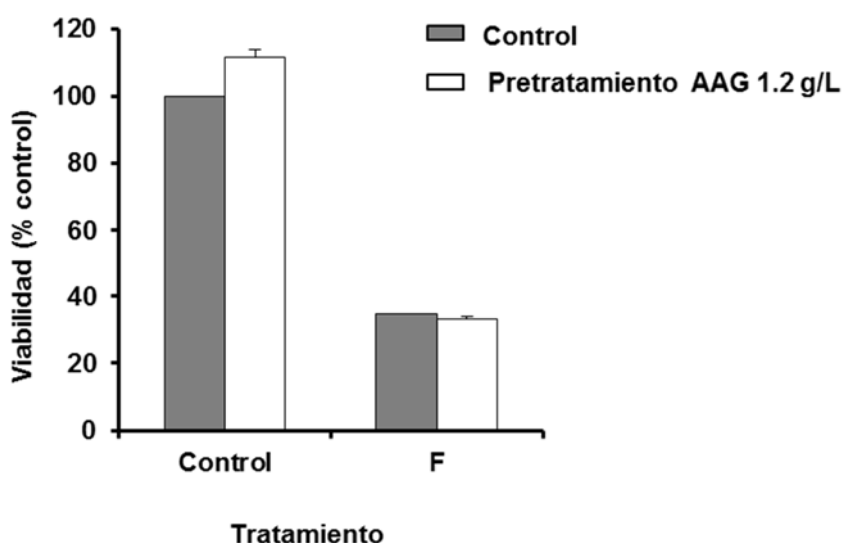


2. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD Y DE LA ACTIVACIÓN DE RUTAS DE RESISTENCIA EN CÉLULAS DE MM EN PRESENCIA DE ALTAS CONCENTRACIONES DE AAG.

Una segunda explicación para este efecto inhibitorio de la AAG sobre la actividad de filanesib es que AAG modifique de alguna manera la biología de las células de mieloma que pueda explicar la inhibición de la eficacia de filanesib. Para comprobarlo, en primer lugar, se expusieron células MM.1S a altas concentraciones de AAG durante 48 horas, posteriormente se lavaron para retirar la proteína del medio y se trataron con filanesib (F), transcurridas 48 horas se midió la viabilidad celular mediante ensayo MTT (Figura 3.7). Se observó, que el pretratamiento con AAG no afectó a la viabilidad de las células mielomatosas, siendo sin AAG del 100 % y con AAG del 112%. Además, tampoco se inhibía la

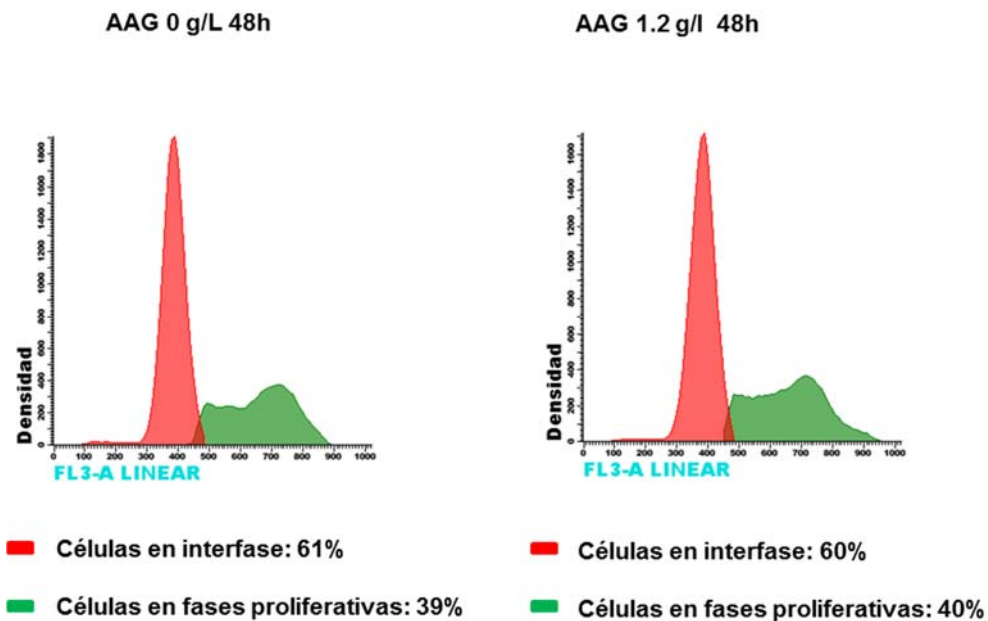
eficacia de filanesib, lo que sugiere que el efecto de AAG es dependiente de su presencia en el medio de cultivo y no de su acción sobre las células de MM.

Figura 3.7 Análisis de la viabilidad de células MM.1S pre cultivadas con AAG 48 horas, lavadas para retirar la proteína del medio y posteriormente tratadas con filanesib durante 48 horas (F=filanesib, 10 nM). Gráfico representativo de dos experimentos independientes.



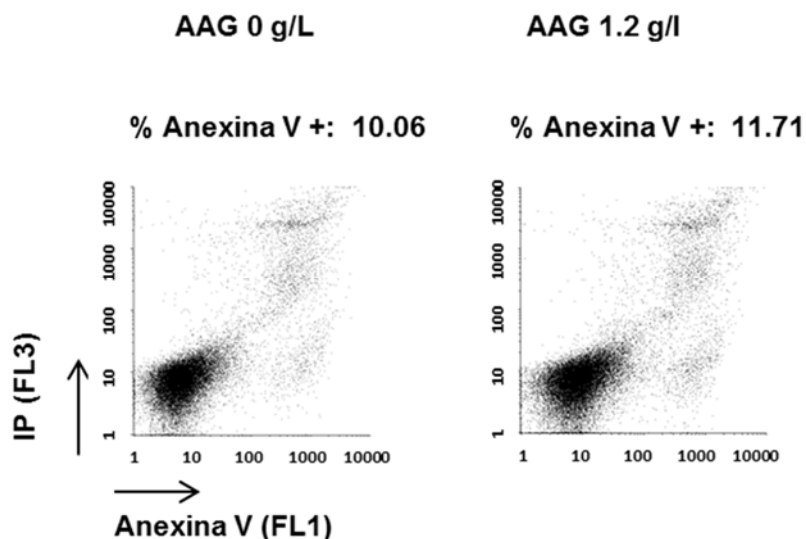
En segundo lugar, se evaluaron los posibles cambios biológicos inducidos en las células de mieloma por la presencia de AAG analizando las rutas principalmente alteradas por el tratamiento con el fármaco: el ciclo celular y la apoptosis. Dado que filanesib es un fármaco eficaz en células en mitosis, la disminución de su eficacia se podría deber a que la proteína AAG indujera una disminución de células en fases proliferativas. Para comprobarlo, se trataron células MM.1S con AAG durante 48 horas, transcurrido este tiempo y por marcaje de ADN con DRAQ5 se analizó por citometría de flujo el perfil del ciclo celular (Figura 3.8). Se observó que el porcentaje de células en interfase y en fases proliferativas era similar al de las células control, no expuestas a la proteína AAG, indicando que esta proteína no induce cambios en el ciclo celular que expliquen la resistencia a filanesib.

Figura 3.8 Análisis del perfil del ciclo celular por marcaje con Draq5 de MM.1S en ausencia y en presencia de altos niveles de AAG en un cultivo de 48 horas. Imagen representativa de dos experimentos independientes.



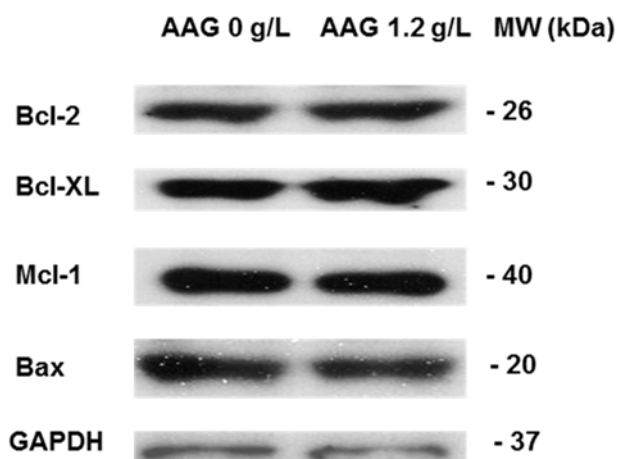
Otra posible explicación podría ser que la proteína AAG estuviera favoreciendo la supervivencia celular a filanesib activando vías antiapoptóticas en las células expuestas a altos niveles de la misma. Por ello, se analizaron los posibles cambios en la inducción de la apoptosis por citometría de flujo y por western blot. En primer lugar, se observó que el cultivo de la línea celular MM.1S con esta proteína a una dosis de 1.2 g/l durante 48 horas no afectó a la viabilidad celular analizada por citometría de flujo con doble marcaje con Anexina V/ Ioduro de Propidio, siendo ésta similar (Figura 3.9).

Figura 3.9 Análisis de la inducción de la apoptosis por doble marcaje con anexina V y ioduro de propidio en MM.1S en ausencia y en presencia de altos niveles de AAG en un cultivo de 48 horas. Imagen representativa de dos experimentos independientes.



Posteriormente, en las mismas condiciones experimentales y utilizando la línea celular MM.1S se analizaron por Western Blot los niveles basales de proteínas antiapoptóticas: Bcl-2, Bcl-xl y Mcl-1, esta última, clave en la respuesta a filanesib. No se observaron cambios en los mismos. Tampoco se apreciaron cambios en los niveles de la proteína proapoptótica Bax, propuesta en el capítulo 1 del presente trabajo como un posible biomarcador de respuesta a filanesib (Figura 3.10), indicando que la resistencia a filanesib no es debida a una activación de vías de supervivencia en células expuestas a altos niveles de AAG.

Figura 3.10 Evaluación de los niveles basales de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 y de la proapoptótica Bax en MM.1S en ausencia y en presencia de altos niveles de AAG durante 48 hora. Imagen representativa de dos experimentos independientes.



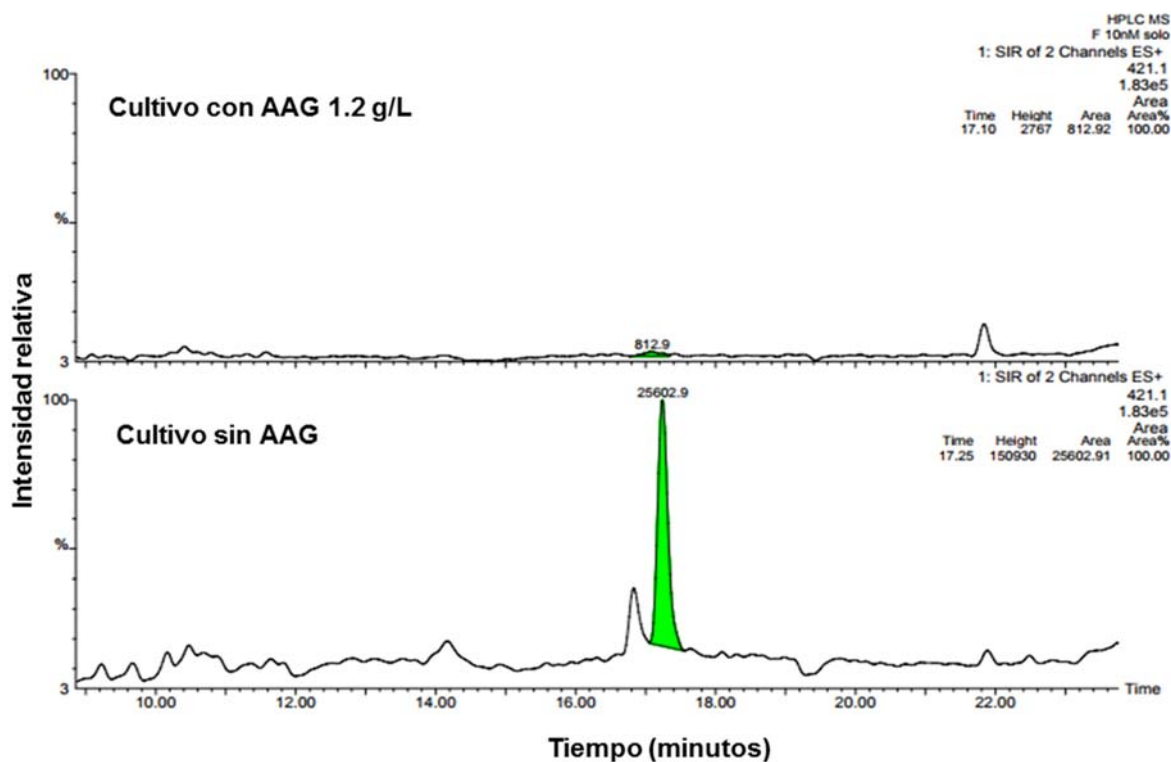
3. EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA CAPACIDAD DE UNIÓN Y SECUESTRO DE LA PROTEÍNA PLASMÁTICA AAG A FILANESIB.

Una vez demostrado que la proteína AAG actúa única y directamente sobre la molécula de filanesib, se analizó el mecanismo específico de esta interacción. La proteína AAG podría estar interaccionando de diferentes formas con filanesib: 1) bloqueando el sitio activo del fármaco impidiendo la correcta unión a la proteína KSP; 2) modificando la conformación de la molécula de filanesib inactivándolo, o alterando las características físico-químicas del fármaco haciéndolo inaccesible a la célula; o 3) uniéndose directamente al fármaco secuestrándolo e impidiendo su acceso a la célula. En este sentido, hay que tener en cuenta que la AAG es una proteína plasmática con una gran capacidad de interacción con fármacos, sobre todo con moléculas de carácter básico ²³⁷, como es el caso de filanesib. De hecho, como se comentó al inicio de este capítulo, estudios farmacocinéticos previos han demostrado que la afinidad de AAG a filanesib es elevada, con un bajo valor de la Kd. Además, en pacientes con altos niveles de esta proteína y que no responden a filanesib se ha detectado una alteración el perfil de distribución del fármaco en el organismo, disminuyendo

su presencia en los tejidos y su aclaramiento. Todo ello parece indicar que la causa de esta interacción es el secuestro del fármaco.

Para comprobarlo, se cuantificó *in vitro* la fracción libre de filanesib en presencia de la proteína AAG. Para ello, se incubó filanesib a 10 nM solo o conjuntamente con AAG a 1.2 g/L en las mismas condiciones en las que se realizaron los estudios de eficacia pero en ausencia de células. Transcurrido este tiempo se filtraron las muestras con ayuda de un filtro que retiene proteínas en el rango del peso molecular de la AAG y todas aquellas moléculas unidas a estas proteínas. Posteriormente, mediante centrifugación, se recuperó el sobrenadante que contendría la fracción libre de filanesib, no unida a la proteína AAG. Este sobrenadante se analizó por cromatografía líquida con detector de masas de cuadrupolo. La información que muestra el espectrómetro de masas representada en la figura 3.11 es una gráfica de intensidad relativa vs. la relación carga/masa determinada por el tiempo de llegada al detector del espectrómetro de masas. La detección de la molécula de filanesib representado en verde, se hizo siguiendo su señal de unidad de masa atómica tras ionización positiva con electrospray. En los gráficos se representa la molécula más abundante o “pico base” al que se le asignó el valor de 100 y todos los demás se reportaron en relación a la intensidad de este, el pico base corresponde a la molécula de filanesib. Se demostró que la fracción libre de filanesib era prácticamente inapreciable cuando se incubaba conjuntamente con altas concentraciones de AAG indicando que la proteína AAG estaba secuestrando al fármaco e impidiendo que esté acceda a las células de MM y por ello anulaba la eficacia del fármaco.

Figura 3.11 Análisis cuantitativo por espectrometría de masas de la fracción libre de filanesib a 10 nM (en verde) en ausencia (Control) y en presencia de 1.2 g/l de AAG en un cultivo de 48 horas. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

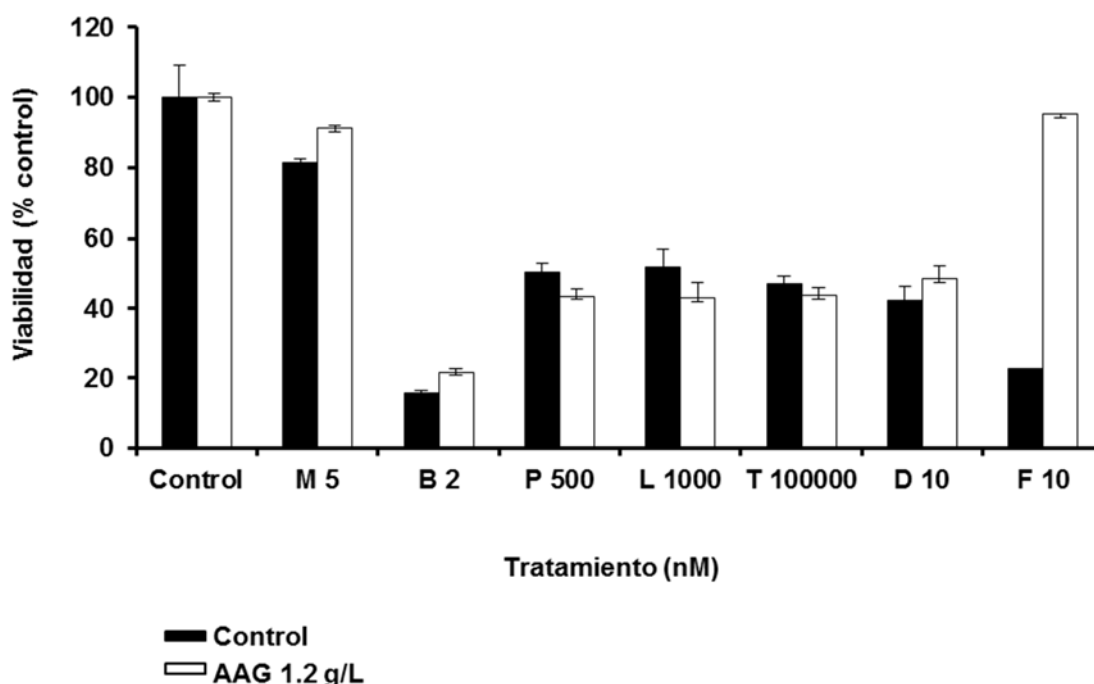


4. ANÁLISIS DE LA EFICACIA PRECLÍNICA DE FÁRMACOS ANTI-MIELOMA EN PRESENCIA DE LA PROTEÍNA PLASMÁTICA AAG.

Para evaluar la eficacia *in vitro* de algunos de estos agentes en presencia de AAG, se trató a las células MM.1S con concentraciones eficaces de melfalán, bortezomib, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, dexametasona y filanesib, este último utilizado como control positivo, en ausencia y en presencia de AAG a 1.2 g/L. Se observó que la presencia de AAG únicamente inhibía de manera significativa la eficacia de filanesib, mientras que no variaba la eficacia del resto de fármacos anti-mieloma (Figura 3.12).

Figura 3.12 Evaluación de la eficacia preclínica de fármacos anti-mieloma (F= filanesib; M= melfalán; B= bortezomib; P= pomalidomida; L= lenalidomida; T= talidomida; D= dexametasona) en ausencia o en presencia

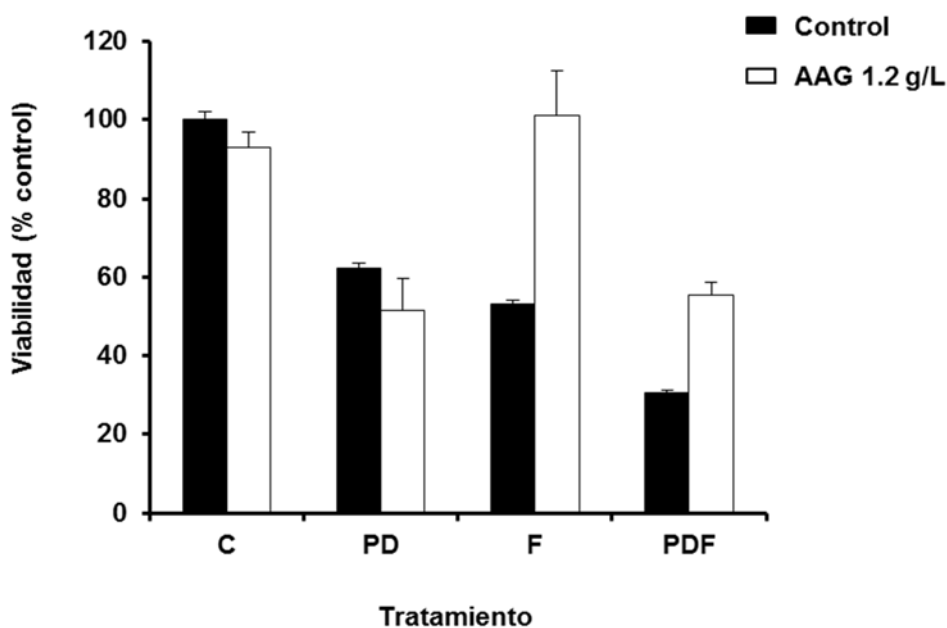
de 1.2 g/L de AAG a 48 horas en la línea celular MM.1S. Gráfico representativo de dos experimentos independientes.



La unión de fármacos y proteínas plasmáticas es poco específica y usualmente lábil y reversible, generalmente a través de enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y, con menos frecuencia, enlaces covalentes. Esto implica que un fármaco puede ser desplazado de su unión a la proteína por otro fármaco. Por esto y dado que, en la actualidad se está llevando a cabo un ensayo clínico en el contexto del grupo español de MM con filanesib en combinación con pomalidomida y dexametasona, se planteó analizar si la presencia de AAG tendría algún efecto sobre dicha combinación. Por ello, se trataron células MM.1S con estos agentes en monoterapia (considerando a pomalidomida y dexametasona como agente único) y en combinación, en ausencia y en presencia de AAG durante 48 horas y se analizó la viabilidad celular por cuantificación de la metabolización del MTT (Figura 3.13). La presencia de AAG inhibió completamente la eficacia de filanesib tanto en monoterapia como en combinación y no alteró la eficacia de pomalidomida y dexametasona (viabilidad celular sin AAG: C 100 %, PD 62 %, F 53 %, PDF 31 %; con AAG: C 93 %, PD 51 %, F 100 %, PDF 55 %). Es importante notar que la eficacia de PDF en presencia de AAG es la misma que la de PD en esta misma

situación, demostrando la inhibición completa de la actividad de filanesib también en la combinación.

Figura 3.13 Evaluación de la eficacia preclínica de PD, F o PDF en ausencia o en presencia de 1.2 g/L de AAG a 48 horas en la línea celular MM.1S (P=pomalidomida, 500 nM; D= dexametasona, 10 nM; F=filanesib, 1 nM). Gráfico representativo de dos experimentos independientes.



5. ANÁLISIS DEL REACTANTE DE FASE AGUDA ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA HUMANA COMO BIOMARCADOR DE RESPUESTA EN MIELOMA MÚLTIPLE. DISCUSIÓN.

La reacción de fase aguda es un proceso que se desencadena cuando el organismo sufre alguna agresión (infección, traumatismo, intervención quirúrgica, etc). En esta situación, en el hígado, comienzan a sintetizarse las proteínas reactantes que cumplirán con su función protectora del organismo al limitar la agresión y contribuir a la reparación. La AAG también conocida como orosomucoide, es una de ellas. Sus niveles séricos que normalmente varían de 0.4 a 1 g/L ²³⁴ pueden aumentar de dos a cinco veces ^{234,235}. Pero no solo en estas situaciones se ha observado aumento de esta glicoproteína, se ha detectado que sus niveles plasmáticos pueden estar elevados en pacientes con cáncer ^{234, 246}. De hecho, en la década de los 70 y los 80, muchos estudios

presentaron a la AAG como un "marcador de enfermedad" ²³⁷⁻²⁴⁰. Se encontraron aumentos significativos de AAG en pacientes con cáncer de pulmón y gastrointestinales activos en comparación con pacientes con enfermedad inactiva. Además, en pacientes con cáncer colorrectal tratados con 5-fluorouracilo, los niveles elevados de AAG se correlacionaron con la falta de respuesta a la terapia ²³⁹. En otro estudio ²³⁸, se ha demostrado que la AAG es altamente sensible y específica en la detección del cáncer de pulmón. En este mismo estudio, la normalización de los niveles de AAG durante la quimioterapia se correlacionó con una supervivencia libre de recaída en cáncer de pulmón. En línea con estas observaciones, también se han identificado niveles altos de AAG en pacientes con MM ^{228, 241}. Dado que la producción de esta proteína es estimulada por la presencia de citoquinas, entre ellas la interleucina 6 (IL6) ^{242, 243}, factor de mal pronóstico para el MM, se han realizado estudios de correlación entre los niveles de IL6 junto con los de la AAG y los diferentes estadios de la enfermedad, así como con la supervivencia de pacientes con MM. De este modo, se han correlacionado altos niveles de AAG con estadios avanzados de la enfermedad y con una menor esperanza de vida ²⁴¹.

No es bien conocido si esta proteína, al igual que sucede con la IL6, está ejerciendo un efecto directo sobre las células de MM favoreciendo su supervivencia. Asimismo, la función biológica de esta proteína aún no está clara. En este sentido, al igual que en otros reactantes de fase aguda, se han identificado varias funciones inmunosupresoras ²⁴⁴; inhibiendo, entre otras funciones, la fagocitosis ²⁴⁵, la activación de los neutrófilos ²⁴⁶, la proliferación de los linfocitos ²⁴⁴. Asimismo, presenta funciones inmunomoduladoras ^{247, 248} y otros estudios han demostrado que la AAG en determinadas circunstancias podría tener un efecto anti-apoptótico y protector de los hepatocitos ²⁴⁹.

Hasta que filanesib no ha aparecido como un nuevo fármaco candidato en el tratamiento del MM, no se habían asociado altos niveles plasmáticos de la AAG con ausencia en la respuesta a fármacos anti-mieloma, así como, con una menor supervivencia libre de progresión. El mecanismo por el cual la proteína AAG interacciona con filanesib anulando por completo su actividad antiproliferativa no está aún bien definido.

Desde hace más de medio siglo, numerosos estudios demostraron que la unión de fármacos a la albúmina de suero humano (ASH), conocida como el "receptor silencioso", era uno de los principales determinantes de la distribución, biodisponibilidad y eficacia de los mismos. En las últimas décadas, ha tomado importancia en este aspecto, la AAG. Una considerable cantidad de fármacos con diversas estructuras se unen a esta glicoproteína plasmática ²⁵⁰⁻²⁵³. Aunque su concentración plasmática es mucho más baja que la de la ASH, la AAG es la segunda macromolécula en importancia por su capacidad de unión a fármacos con importantes implicaciones clínicas²⁵⁴⁻²⁶¹. En línea con esto, la AAG ha demostrado una elevada capacidad de unión por filanesib alterando su perfil farmacocinético y disminuyendo su fracción biodisponible por lo que se piensa que la ausencia de eficacia es debida a la unión y subsiguiente secuestro del fármaco.

En este contexto, la AAG podría ser un biomarcador de mal pronóstico para el MM o un biomarcador de respuesta específico para filanesib ¹⁶⁸. Para dilucidarlo, en la actualidad se están realizando varios estudios prospectivos de eficacia de filanesib tanto solo como combinado con carfilzomib ¹⁷⁹ en un ensayo clínico en fase II con pomalidomida y dexametasona en un ensayo clínico en fase Ib/II en pacientes con MM ²²⁰.

Nuestros estudios *in vitro* demuestran que altos niveles de la proteína plasmática AAG efectivamente anulan la eficacia de filanesib, impidiendo que se inhiba correctamente su diana, la proteína KSP. Esta interacción es dependiente de las concentraciones de fármaco y proteína libres, siendo un fenómeno saturable y específico, características típicas de la unión fármacos a proteínas plasmáticas. Además, demostramos mediante espectrometría de masas que la AAG interacciona directamente con la molécula de filanesib, disminuyendo su fracción libre e impidiendo su acceso a la célula.

Por otra parte, y a pesar de ser una molécula cuya producción se estimula, entre otros factores, por IL6 o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) ²⁴⁷, ambas citocinas claves en la proliferación y supervivencia de células

mielomas, demostramos que la AAG, por si sola, no altera ni la proliferación ni la supervivencia de las células de MM. Por lo tanto, muy probablemente, la detección de altos niveles de AAG en estadios avanzados de la enfermedad, así como la disminución de la supervivencia en pacientes con MM asociada a altas concentraciones de esta proteína son efectos indirectos derivados de la presencia de altos niveles de IL6.

Acorde con estos resultados, estudios previos en los que se analizó la correlación entre altos niveles de AAG en pacientes que no responden a filanesib y los diferentes estadios pronósticos para el MM basados en el sistema internacional (ISS) o basados en el perfil citogenético clasificando a estos pacientes como de alto o bajo riesgo, no mostraron ninguna significación estadística ¹⁶⁸.

Además, se demuestra que la proteína AAG no interfiere en la eficacia de otros fármacos anti-mieloma utilizados en la práctica clínica habitual, siendo su actividad específica de filanesib. Por otra parte, nuestros estudios demostraron que la triple combinación filanesib, pomalidomida y dexametasona no es capaz de revertir el efecto inhibitorio de la AAG sobre la eficacia de filanesib, por lo que posiblemente los pacientes tratados con esta combinación y con altos niveles de AAG no se beneficiarán de la misma.

En su conjunto, nuestros datos presentan a la AAG como un biomarcador importante para predecir la respuesta a filanesib, tanto en monoterapia como combinado con otros fármacos anti-mieloma. Este hecho, se encuadra en la perspectiva actual de medicina personalizada en cáncer, que busca determinar qué pacientes se beneficiarían de forma más significativa de un tratamiento determinado o, por el contrario, identificar qué pacientes podrían ser resistentes a una terapia. En el panorama actual del MM hay algunos ejemplos en este sentido como es la particular actividad del inhibidor de Bcl2-2 venetoclax en pacientes con la t(11;14) ¹⁶², venetoclax + bortezomib + dexametasona en pacientes con elevados niveles de Bcl-2 ¹⁶³, o la selección de pacientes para ser tratados con el inhibidor de MEK trametinib basado en la activación de esta vía

en particular ²⁶². Los estudios prospectivos que se están desarrollando en este sentido aportarán más información respecto a la utilidad de AAG como predictor de sensibilidad o resistencia.

DISCUSIÓN FINAL

El mieloma múltiple (MM) es, probablemente, una de las neoplasias hematológicas en las que se ha producido un mayor avance (de la biología a la terapéutica) en las últimas décadas. El avance en el conocimiento de la biología del MM ha permitido comprender mejor el origen de la enfermedad, las alteraciones que aparecen intrínsecamente en la célula plasmática, así como las alteraciones asociadas a su interacción con el microambiente medular. Todo ello ha permitido identificar diferentes vías y rutas que utilizan las células plasmáticas tumorales para proliferar, expandirse y producir sintomatología a distancia. Unido a este gran avance, en el momento actual, hay una gran cantidad de nuevos fármacos que se están incorporando al tratamiento de los pacientes con MM, lo que hace que cada vez mayor número de fármacos estén disponibles para el tratamiento de estos pacientes en la clínica diaria. Esto está contribuyendo claramente a prolongar de forma importante la supervivencia; hasta tal punto que, actualmente existe una pequeña fracción de pacientes potencialmente curados, ya que llevan muchos años en remisión sin ningún dato de enfermedad. A pesar de ello, la mayoría de los pacientes finalmente recaen, y el tratamiento en esta etapa puede ser particularmente complejo. En este punto, es particularmente importante identificar nuevos fármacos, con nuevos mecanismos de acción que consigan rescatar a estos pacientes; siempre teniendo en cuenta que, al ser el MM una enfermedad altamente heterogénea desde el punto de vista genético y clínico, posiblemente la eficacia de estos nuevos agentes administrados en monoterapia no resolverá el problema y será preciso abordar la enfermedad con una combinación más eficiente. Aquí, la investigación traslacional tiene un papel primordial, transformando los hallazgos que surgen de la investigación preclínica y de los estudios clínicos en nuevas aplicaciones clínicas que mejoran la calidad de vida de los pacientes. Este objetivo es precisamente el que se ha perseguido en la presente Tesis Doctoral.

Este trabajo de investigación demuestra la eficacia preclínica en MM de un nuevo agente terapéutico, filanesib (ARRY-520), con un nuevo mecanismo de acción, la inhibición directa y específica de la «kinesin spindle protein» (KSP) que únicamente es activa en mitosis. Filanesib ha conseguido lo que otros inhibidores del ciclo celular no pudieron demostrar en MM; ha mostrado eficacia

en pacientes que no respondían a ningún tratamiento disponible con un perfil de toxicidad manejable. Es sorprendente que un agente que actúa exclusivamente en mitosis haya sido capaz de mostrar eficacia clínica en el MM, una enfermedad que se caracteriza por ser poco proliferativa. Los resultados de esta investigación han identificado mecanismos clave de susceptibilidad en la célula mielomatosa tras el tratamiento con este agente que aportan una base más biológica para el uso del mismo. Así, se ha confirmado que la rápida aparición de la muerte celular en mitosis tras la exposición a filanesib viene determinada por la degradación de la proteína antiapoptótica Mcl-1 y, a su vez, se ha presentado a la proteína proapoptótica Bax, otro miembro de la misma familia como un potencial biomarcador de sensibilidad a este fármaco.

Los estudios de eficacia y mecanismo de acción de filanesib, sentaron las bases para realizar la evaluación preclínica *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de este agente en combinación con pomalidomida y dexametasona, el siguiente objetivo de la presente Tesis Doctoral. Los datos expuestos en esta Tesis apoyan el papel que esta combinación tiene en el tratamiento del MM, demostrando que todos los IMiD con dexametasona cooperaron sinérgicamente con filanesib, siendo la combinación con pomalidomida la más sinérgica. Los estudios de eficacia *in vitro* y, sobre todo, los estudios *in vivo* en plasmocitomas grandes, con células muy proliferativas demostraron que las células en división son la diana de esta combinación. Sorprendentemente, estos fármacos en combinación cooperan sinérgicamente para inhibir a la KSP y para inducir una muerte rápida por apoptosis en células proliferativas, caracterizada por un aumento y activación de la proteína proapoptótica Bax. Así, se identificó un posible grupo de pacientes que se podrían beneficiar con esta combinación, el grupo de pacientes de peor pronóstico, con la enfermedad en un estadio más avanzado, en el que las células son más agresivas y proliferativas. Estos estudios sentaron las bases para el ensayo clínico POMDEFIL que se está realizando en pacientes con MM refractario y del que ya se tienen algunos resultados preliminares, presentados recientemente en el último congreso americano de hematología, que a su vez confirmaron la sinergia preclínica de la combinación, con un tasa de respuestas del 65 % y una SLP de 7 meses²²⁰.

Otro apartado no menos importante en la presente Tesis Doctoral es la evaluación preclínica *in vitro* de la AAG como posible biomarcador de respuesta en el MM. Como ya se ha comentado anteriormente, este agente se ha visto que interfiere inhibiendo eficacia de filanesib cuando se presenta elevado en plasma y, hasta la fecha, no estaba claro si era un biomarcador específico para filanesib o un marcador de mal pronóstico en el MM. Los resultados de los estudios *in vitro* de eficacia y mecanismo de acción en células de MM demostraron que es un biomarcador de respuesta específico para la resistencia a filanesib y que no presenta interacción con otros agentes anti-mieloma, ni favorece vías de resistencia en la célula mielomatosa, al menos *in vitro*. A su vez, aportaron una información muy valiosa, puesto que la triple combinación de pomalidomida con dexametasona y filanesib no es eficaz cuando los niveles de esta proteína son elevados, indicando que pacientes con altos niveles plasmáticos de AAG posiblemente no se beneficiarán de la triple combinación. Actualmente, se está realizando un estudio prospectivo en el ensayo clínico POMDEFIL sobre el que pronto se presentarán resultados en este sentido.

Todos estos datos presentados en la presente Tesis Doctoral, en su conjunto, favorecen la aplicación de una medicina personalizada en pacientes con MM, cuyo objetivo fundamental es administrar el tratamiento adecuado a cada paciente según las características concretas de su enfermedad. En este sentido se están desarrollando numerosas terapias dirigidas a diferentes subgrupos de pacientes con MM. Así, vemurafenib, un inhibidor selectivo de BRAF, ha resultado ser eficaz en pacientes refractarios con mutaciones en BRAF²⁶², no obstante, la respuesta en pacientes ha sido corta provocando tumores más agresivos con hiperactivación de ERK. La combinación de inhibidores BRAF con inhibidores de MEK, como el trametinib podría reducir el riesgo y aumentar la eficacia en estos pacientes. Otro ejemplo es el venetoclax, inhibidor de la proteína antiapoptótica Bcl-2, particularmente eficaz en pacientes con traslocación t(11:14). Recientemente se ha reportado que un paciente con t(11:14) y del17p, presenta una respuesta mantenida con el tratamiento venetoclax + dexametasona¹⁶². Según estudios preliminares, la presencia de

t(11;14), niveles elevados de Bcl-2 y bajos de Mcl-1 o Bcl-XL, así como la presencia de marcadores de célula B podrían predecir la respuesta a venetoclax y permitirían identificar los candidatos idóneos para recibir dicho fármaco. Actualmente se está llevando a cabo un estudio fase III para determinar la eficacia de este nuevo fármaco en combinación con el estándar bortezomib y dexametasona.

Este cambio de paradigma es prometedor para el MM, aunque a la vez surgen nuevos desafíos en el camino; como son la heterogeneidad genética y clonal de esta enfermedad, las mutaciones concomitantes que se pueden dar en una misma vía de señalización celular que lleva a la resistencia a los tratamientos y la posible ventaja adaptativa de un subclon de células al tratamiento. En este sentido, la terapia combinatorial, que ataca a diferentes rutas de supervivencia oncogénica parece ser la más adecuada para solventar este problema, así como, la implementación de estrategias de monitorización de los distintos subclones y de tratamiento en cada caso con el fin de administrar combinaciones de fármacos en un contexto clínico y biológico adecuado.

CONCLUSIONES

1. La presencia de niveles elevados de **KSP** en pacientes homogéneamente tratados se ha asociado con una peor supervivencia.
2. El nuevo inhibidor de la “kinesin spindle protein” (KSP), **filanesib (ARRY-520)**, muestra una elevada eficacia y rápida actividad en modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de mieloma múltiple (MM), confirmando la eficacia clínica observada en pacientes refractarios o en recaída.
3. **Filanesib** provoca parada en el ciclo celular, en fases proliferativas, a través de la inhibición de KSP, seguida de pérdida de potencial de membrana mitocondrial y muerte por apoptosis en células de MM.
4. La eficacia preclínica de **filanesib** se ha correlacionado con los niveles basales y la activación de la proteína proapoptótica **Bax**, que aparece como un potencial biomarcador de sensibilidad específico para este fármaco.
5. En ensayos *in vitro* e *in vivo*, se ha demostrado que **filanesib** muestra un elevado sinergismo con varios **IMiD + dexametasona**, siendo especialmente potente la triple combinación con **pomalidomida**.
6. La combinación **pomalidomida + dexametasona + filanesib** ha demostrado sinergia y eficacia en células plasmáticas de pacientes con MM, sin afectar de manera significativa a la población de linfocitos de dichos pacientes.
7. **Pomalidomida + dexametasona + filanesib** provoca parada en fases proliferativas del ciclo celular y es capaz de potenciar la inhibición de KSP, seguida de pérdida de potencial de membrana mitocondrial y muerte en mitosis.
8. Esta triple combinación potencia la inducción de apoptosis se caracteriza por el aumento de la expresión y de la activación de la proteína proapoptótica **Bax**.

9. Estos datos han sido la base para el ensayo clínico **POMDEFIL** (clinicaltrials.gov Identificador: 02384083) en el contexto del grupo español del MM (GEM) en el que actualmente se está probando la combinación de **pomalidomida + dexametasona + filanesib** en pacientes con MM refractario o en recaída.
10. El reactante de fase aguda, alfa-1 glicoproteína ácida humana (**AAG**), es un biomarcador de resistencia específico para **filanesib**, sin ejercer un efecto directo sobre las células de MM, uniéndose y secuestrando a este agente e impidiendo así que ejerza su actividad *in vitro*.
11. La **AAG** no interfiere en la eficacia *in vitro* de otros agentes utilizados en la clínica diaria del MM.
12. La combinación **pomalidomida + dexametasona + filanesib** no ha sido capaz de revertir la interacción entre **AAG** y **filanesib** *in vitro*, indicando que posiblemente los pacientes que presenten altos niveles de esta proteína no se podrán beneficiar de la sinergia de la triple combinación.

BILIOGRAFÍA

1. Kyle RA and Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2004;351(18):1860-1873.
2. Boccadoro M and Pileri A. Diagnosis, prognosis, and standard treatment of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1997;11(1):111-131.
3. Sirohi B and Powles R. Multiple myeloma. *Lancet*. 2004;363(9412):875-887.
4. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):e538-548.
5. San Miguel JF, Sánchez-Guijo FM. *Hematología: manual básico razonado*. Third ed. Spain:Elsevier; 2010.
6. Swerdlow S, Campo E, Harris N, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press: ; 2008.
7. Kyle RA, Nobrega FT, Kurland LT. Multiple myeloma in Olmsted County, Minnesota, 1945-1964. *Blood*. 1969;33(5):739-745.
8. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17046.
9. Ocio EM, Richardson PG, Rajkumar SV, 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.
10. Palumbo A and Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011;364(11):1046-1060.

11. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*. 1998;91(1):3-21.
12. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, et al. Intraclonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia*. 2014;28(2):384-390.
13. Lopez-Corral L, Gutierrez NC, Vidriales MB, et al. The progression from MGUS to smoldering myeloma and eventually to multiple myeloma involves a clonal expansion of genetically abnormal plasma cells. *Clin Cancer Res*. 2011;17(7):1692-1700.
14. Lopez-Corral L, Sarasquete ME, Bea S, et al. SNP-based mapping arrays reveal high genomic complexity in monoclonal gammopathies, from MGUS to myeloma status. *Leukemia*. 2012;26(12):2521-2529.
15. Puig N, Conde I, Jimenez C, et al. The predominant myeloma clone at diagnosis, CDR3 defined, is constantly detectable across all stages of disease evolution. *Leukemia*. 2015;29(6):1435-1437.
16. Kukreja A, Hutchinson A, Dhodapkar K, et al. Enhancement of clonogenicity of human multiple myeloma by dendritic cells. *J Exp Med*. 2006;203(8):1859-1865.
17. Yaccoby S. The phenotypic plasticity of myeloma plasma cells as expressed by dedifferentiation into an immature, resilient, and apoptosis-resistant phenotype. *Clin Cancer Res*. 2005;11:7599-7606.
18. Affer M, Chesi M, Chen WG, et al. Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28(8):1725-1735.
19. Lopez-Corral L, Corchete LA, Sarasquete ME, et al. Transcriptome analysis reveals molecular profiles associated with evolving steps of monoclonal gammopathies. *Haematologica*. 2014;99(8):1365-1372.

20. Lopez-Anglada L, Gutierrez NC, Garcia JL, Mateos MV, Flores T, San Miguel JF. P53 deletion may drive the clinical evolution and treatment response in multiple myeloma. *Eur J Haematol.* 2010;84(4):359-361.
21. Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, et al. A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia.* 2012;26(2):349-355.
22. Liu P, Leong T, Quam L, et al. Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. *Blood.* 1996;88(7):2699-2706.
23. Agirre X, Castellano G, Pascual M, et al. Whole-epigenome analysis in multiple myeloma reveals DNA hypermethylation of B cell-specific enhancers. *Genome Res.* 2015;25(4):478-487.
24. Heuck CJ, Mehta J, Bhagat T, et al. Myeloma is characterized by stage-specific alterations in DNA methylation that occur early during myelomagenesis. *J Immunol.* 2013;190(6):2966-2975.
25. Zhan F, Huang Y, Colla S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood.* 2006;108(6):2020-2028.
26. Pichiorri F, Suh SS, Rocci A, et al. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 Impairs the p53/MDM2 Autoregulatory Loop in Multiple Myeloma Development. *Cancer Cell.* 2016;30(2):349-351.
27. Misiewicz-Krzeminska I, Sarasquete ME, Quwaider D, et al. Restoration of microRNA-214 expression reduces growth of myeloma cells through positive regulation of P53 and inhibition of DNA replication. *Haematologica.* 2013;98(4):640-648.
28. Gutierrez NC, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, et al. Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia.* 2010;24(3):629-637.

29. Ell B and Kang Y. MicroRNAs as regulators of tumor-associated stromal cells. *Oncotarget*. 2013;4(12):2166-2167.
30. Zhang Y, Yang P, Wang XF. Microenvironmental regulation of cancer metastasis by miRNAs. *Trends Cell Biol*. 2014;24(3):153-160.
31. Munshi NC and Avet-Loiseau H. Genomics in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2011;17(6):1234-1242.
32. Basak GW, Srivastava AS, Malhotra R, Carrier E. Multiple myeloma bone marrow niche. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009;10(3):345-346.
33. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(8):585-598.
34. De Raeye HR and Vanderkerken K. The role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Histol Histopathol*. 2005;20(4):1227-1250.
35. Yasui H, Hideshima T, Richardson PG, Anderson KC. Novel therapeutic strategies targeting growth factor signalling cascades in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2006;132(4):385-397.
36. Hideshima T and Anderson KC. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(12):927-937.
37. Podar K, Richardson PG, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC. The malignant clone and the bone-marrow environment. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(4):597-612.
38. Dalton WS. The tumor microenvironment: focus on myeloma. *Cancer Treat Rev*. 2003;29 Suppl 1:11-19.

39. Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest.* 2013;123(4):1542-1555.
40. Wang J, Hendrix A, Hernot S, et al. Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells. *Blood.* 2014;124(4):555-566.
41. Arendt BK, Walters DK, Wu X, Tschumper RC, Jelinek DF. Multiple myeloma cell-derived microvesicles are enriched in CD147 expression and enhance tumor cell proliferation. *Oncotarget.* 2014;5(14):5686-5699.
42. Umezu T, Tadokoro H, Azuma K, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood.* 2014;124(25):3748-3757.
43. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3-11.
44. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):107-120.
45. Rossi D and Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica.* 2003;88(2):212-218.
46. Rowan S and Fisher DE. Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia.* 1997;11(4):457-465.
47. Adams JM and Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(1):61-66.
48. Igney FH and Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(4):277-288.

49. Sorenson CM. Bcl-2 family members and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1644(2-3):169-177.
50. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:217-245.
51. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267(5203):1456-1462.
52. 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.
53. Darzynkiewicz Z and Traganos F. Measurement of apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 1998;62:33-73.
54. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-776.
55. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 1995;182(5):1545-1556.
56. Ormerod MG, Sun XM, Brown D, Snowden RT, Cohen GM. Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta Oncol*. 1993;32(4):417-424.
57. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980;68:251-306.
58. Van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenberghe P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ*. 2002;9(10):1031-1042.
59. Thornberry NA and Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281(5381):1312-1316.

60. Sarvothaman S, Undi RB, Pasupuleti SR, Gutti U, Gutti RK. Apoptosis: role in myeloid cell development. *Blood Res.* 2015;50(2):73-79.
61. Danial NN and Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004;116(2):205-219.
62. Debatin KM and Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene.* 2004;23(16):2950-2966.
63. Ashkenazi A and Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281(5381):1305-1308.
64. Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med.* 1996;2(5):574-577.
65. Jazirehi AR, Ng CP, Gan XH, Schiller G, Bonavida B. Adriamycin sensitizes the adriamycin-resistant 8226/Dox40 human multiple myeloma cells to Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated (TRAIL) apoptosis. *Clin Cancer Res.* 2001;7(12):3874-3883.
66. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol.* 2002;192(2):131-137.
67. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene.* 1998;17(25):3225-3236.
68. Schulze-Bergkamen H and Krammer PH. Apoptosis in cancer--implications for therapy. *Semin Oncol.* 2004;31(1):90-119.
69. Adams JM and Cory S. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):27-36.
70. Danial NN. BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene.* 2008;27 Suppl 1:S53-70.
71. Zhang B, Gojo I, Fenton RG. Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood.* 2002;99(6):1885-1893.

72. Kroemer G and Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med.* 2005;11(7):725-730.
73. Jourdan M, Veyrune JL, De Vos J, Redal N, Couderc G, Klein B. A major role for Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6-induced survival of human myeloma cells. *Oncogene.* 2003;22(19):2950-2959.
74. Cande 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):4727-4734.
75. 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.
76. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 2001;412(6842):95-99.
77. Maes A, Menu E, Veirman K, Maes K, Vand Erkerken K, De Bruyne E. The therapeutic potential of cell cycle targeting in multiple myeloma. *Oncotarget.* 2017;8(52):90501-90520.
78. Malumbres M and Carnero A. Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog Cell Cycle Res.* 2003;5:5-18.
79. Takeda DY and Dutta A. DNA replication and progression through S phase. *Oncogene.* 2005;24(17):2827-2843.
80. Ekholm SV and Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(6):676-684.
81. Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene.* 2005;24(17):2796-2809.
82. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol.* 2003;13(2):65-70.

83. Dao DD, Sawyer JR, Epstein J, Hoover RG, Barlogie B, Tricot G. Deletion of the retinoblastoma gene in multiple myeloma. *Leukemia*. 1994;8(8):1280-1284.
84. Malumbres M and Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci*. 2005;30(11):630-641.
85. Sherr CJ and Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999;13(12):1501-1512.
86. Gartel AL and Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res*. 1999;246(2):280-289.
87. Urashima M, Teoh G, Chauhan D, et al. Interleukin-6 overcomes p21WAF1 upregulation and G1 growth arrest induced by dexamethasone and interferon-gamma in multiple myeloma cells. *Blood*. 1997;90(1):279-289.
88. Gonzalez M, Mateos MV, Garcia-Sanz R, et al. De novo methylation of tumor suppressor gene p16/INK4a is a frequent finding in multiple myeloma patients at diagnosis. *Leukemia*. 2000;14(1):183-187.
89. Mateos MV, Garcia-Sanz R, Lopez-Perez R, et al. Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival. *Br J Haematol*. 2002;118(4):1034-1040.
90. Uchida T, Kinoshita T, Ohno T, Ohashi H, Nagai H, Saito H. Hypermethylation of p16INK4A gene promoter during the progression of plasma cell dyscrasia. *Leukemia*. 2001;15(1):157-165.
91. Morse L, Chen D, Franklin D, Xiong Y, Chen-Kiang S. Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18(INK4c) and IL-6. *Immunity*. 1997;6(1):47-56.
92. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):e538-48.

93. Kuehl WM and Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):175-187.
94. Rajkumar SV. Myeloma today: Disease definitions and treatment advances. *Am J Hematol*. 2016;91(1):90-100.
95. Alegre A, Lamana M, Arranz R, et al. Busulfan and melphalan as conditioning regimen for autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1995;91(2):380-386.
96. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med*. 1996;335(2):91-97.
97. Palumbo A, Cavallo F, Gay F, et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2014;371(10):895-905.
98. McCarthy PL and Hahn T. Strategies for induction, autologous hematopoietic stem cell transplantation, consolidation, and maintenance for transplantation-eligible multiple myeloma patients. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:496-503.
99. Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1999;341(21):1565-1571.
100. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2007;357(21):2123-2132.
101. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2005;352(24):2487-2498.
102. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, et al. Persistent overall survival benefit and no increased risk of second malignancies with bortezomib-melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone in patients with previously untreated multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2013;31(4):448-455.

103. Mateos MV and San Miguel JF. How should we treat newly diagnosed multiple myeloma patients? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:488-495.
104. Rosinol L, Oriol A, Teruel AI, et al. Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETHEMA/GEM study. *Blood*. 2012;120(8):1589-1596.
105. Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, et al. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *N Engl J Med*. 2014;371(10):906-917.
106. Palumbo A, Offidani M, Patriarca F, Petrucci MT, Cavo M. Bendamustine for the treatment of multiple myeloma in first-line and relapsed-refractory settings: a review of clinical trial data. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(3):559-567.
107. Ludwig H, Sonneveld P, Davies F, et al. European perspective on multiple myeloma treatment strategies in 2014. *Oncologist*. 2014;19(8):829-844.
108. Alegre A, Oriol-Rocafiguera A, Garcia-Larana J, et al. Efficacy, safety and quality-of-life associated with lenalidomide plus dexamethasone for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma: the Spanish experience. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(9):1714-1721.
109. Mateos MV, Hernandez MT, Giraldo P, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2013;369(5):438-447.
110. Alegre A, Gironella M, Bailen A, Giraldo P. Zoledronic acid in the management of bone disease as a consequence of multiple myeloma: a review. *Eur J Haematol*. 2014;92(3):181-188.
111. Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K, Barlogie B. Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood*. 1992;80(4):887-890.

112. Alexanian R, Barlogie B, Dixon D. High-dose glucocorticoid treatment of resistant myeloma. *Ann Intern Med.* 1986;105(1):8-11.
113. Chauhan D, Hideshima T, Rosen S, Reed JC, Kharbanda S, Anderson KC. Apaf-1/cytochrome c-independent and Smac-dependent induction of apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem.* 2001;276(27):24453-24456.
114. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell.* 2007;12(2):115-130.
115. Moreau P, Misbahi R, Milpied N, et al. Long-term results (12 years) of high-dose therapy in 127 patients with de novo multiple myeloma. *Leukemia.* 2002;16(9):1838-1843.
116. Gomez-Bougie P, Oliver L, Le Gouill S, Bataille R, Amiot M. Melphalan-induced apoptosis in multiple myeloma cells is associated with a cleavage of Mcl-1 and Bim and a decrease in the Mcl-1/Bim complex. *Oncogene.* 2005;24(54):8076-8079.
117. Kisselev AF and Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.* 2001;8(8):739-758.
118. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999;59(11):2615-2622.
119. Anderson KC. Progress and Paradigms in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res.* 2016;22(22):5419-5427.
120. Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, et al. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood.* 2000;96(9):2943-2950.
121. Escoubet-Lozach L, Lin IL, Jensen-Pergakes K, et al. Pomalidomide and lenalidomide induce p21 WAF-1 expression in both lymphoma and multiple

myeloma through a LSD1-mediated epigenetic mechanism. *Cancer Res.* 2009;69(18):7347-7356.

122. Andhavarapu S and Roy V. Immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Expert Rev Hematol.* 2013;6(1):69-82.

123. Lagrue K, Carisey A, Morgan DJ, Chopra R, Davis DM. Lenalidomide augments actin remodeling and lowers NK-cell activation thresholds. *Blood.* 2015;126(1):50-60.

124. LeBlanc R, Hideshima T, Catley LP, et al. Immunomodulatory drug costimulates T cells via the B7-CD28 pathway. *Blood.* 2004;103(5):1787-1790.

125. San Miguel J, Weisel K, Moreau P, et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(11):1055-1066.

126. Ocio EM, Fernández-Lázaro D, San-Segundo L, et al. In vivo murine model of acquired resistance in myeloma reveals differential mechanisms for lenalidomide and pomalidomide in combination with dexamethasone. *Leukemia.* 2015;29(3):705-14.

127. Dimopoulos MA, Palumbo A, Corradini P, et al. An Updated Analysis of the Stratus Trial (MM-010): Safety and Efficacy of Pomalidomide Plus Low-Dose Dexamethasone (POM + LoDEX) in Patients (Pts) with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM).[abstract]. *Blood.* 2015;126:4225;.

128. Fouquet G, Pegourie B, Macro M, et al. Safe and prolonged survival with long-term exposure to pomalidomide in relapsed/refractory myeloma. *Ann Oncol.* 2016;27(5):902-907.

129. Dimopoulos MA, Palumbo A, Corradini P, Cavo M, Delforge M., Weisel Kea. The STRATUS trial (MM-010): A single-arm phase 3b study of pomalidomide plus low-dose dexamethasone (POM + LoDEX) in refractory or relapsed and refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2014;32(5s):Suppl.

130. Ocio EM and San Miguel JF. The DAC system and associations with multiple myeloma. *Invest New Drugs*. 2010;28 Suppl 1:S28-35.
131. Harada T, Hideshima T, Anderson KC. Histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma: from bench to bedside. *Int J Hematol*. 2016;104(3):300-309.
132. Laubach JP, Moreau P, San-Miguel JF, Richardson PG. Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2015;21(21):4767-4773.
133. Ropero S and Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol*. 2007;1(1):19-25.
134. Kalushkova A, Fryknas M, Lemaire M, et al. Polycomb target genes are silenced in multiple myeloma. *PLoS One*. 2010;5(7):e11483.
135. Atadja P. Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges. *Cancer Lett*. 2009;280(2):233-241.
136. Maiso P, Carvajal-Vergara X, Ocio EM, et al. The histone deacetylase inhibitor LBH589 is a potent antimyeloma agent that overcomes drug resistance. *Cancer Res*. 2006;66(11):5781-5789.
137. Richardson PG, Lonial S, Jakubowiak AJ, Harousseau JL, Anderson KC. Monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2011;154(6):745-754.
138. Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, et al. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2015;373(13):1207-1219.
139. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(8):754-66.
140. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(14):1319-1331.

141. Liu YC, Szmania S, van Rhee F. Profile of elotuzumab and its potential in the treatment of multiple myeloma. *Blood Lymphat Cancer*. 2014;2014(4):15-27.
142. Gormley NJ, Ko CW, Deisseroth A, et al. FDA Drug Approval: Elotuzumab in Combination with Lenalidomide and Dexamethasone for the Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2017;23(22):6759-6763.
143. Afifi S, Michael A, Lesokhin A. Immunotherapy: A New Approach to Treating Multiple Myeloma with Daratumumab and Elotuzumab. *Ann Pharmacother*. 2016;50(7):555-568.
144. Paiva B, Azpilikueta A, Puig N, et al. PD-L1/PD-1 presence in the tumor microenvironment and activity of PD-1 blockade in multiple myeloma. *Leukemia*. 2015;29(10):2110-2113.
145. Maus MV and June CH. CARTs on the road for myeloma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(15):3899-3901.
146. Ghosh A, Mailankody S, Giralto SA, Landgren CO, Smith EL, Brentjens RJ. CAR T cell therapy for multiple myeloma: where are we now and where are we headed? *Leuk Lymphoma*. 2017:1-12.
147. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):295-308.
148. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res*. 2014;24(1):9-23.
149. Paino T, Garcia-Gomez A, Gonzalez-Mendez L, et al. The Novel Pan-PIM Kinase Inhibitor, PIM447, Displays Dual Antimyeloma and Bone-Protective Effects, and Potently Synergizes with Current Standards of Care. *Clin Cancer Res*. 2016.
150. Burki TK. Selinexor and dexamethasone in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2018;19(3):e146-2045(18)30089-5. Epub 2018 Feb 9.

151. Vogl D, Dingli D, Cornell R, Ann Huff C, Jagannath S, Bhutani D. Selinexor and low dose dexamethasone (Sd) in patients with lenalidomide, pomalidomide, bortezomib, carfilzomib and anti-CD38 Ab refractory multiple myeloma (MM): STORM Study. *Blood*. 2016;198:491.
152. Vogl DT, Dingli D, Cornell RF, et al. Selective Inhibition of Nuclear Export With Oral Selinexor for Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2018;36(9):859-866.
153. Cory S and Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(9):647-656.
154. Gauthier ER, Piche L, Lemieux G, Lemieux R. Role of bcl-X(L) in the control of apoptosis in murine myeloma cells. *Cancer Res*. 1996;56(6):1451-1456.
155. Derenne S, Monia B, Dean NM, et al. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood*. 2002;100(1):194-199.
156. Zhang B, Potyagaylo V, Fenton RG. IL-6-independent expression of Mcl-1 in human multiple myeloma. *Oncogene*. 2003;22(12):1848-1859.
157. Krajewski S, Bodrug S, Krajewska M, et al. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am J Pathol*. 1995;146(6):1309-1319.
158. Hermine O, Haioun C, Lepage E, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood*. 1996;87(1):265-272.
159. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*. 1985;229(4720):1390-1393.

160. Miguel-Garcia A, Orero T, Matutes E, et al. Bcl-2 Expression in Plasma Cells from Neoplastic Gammopathies and Reactive Plasmacytosis: a Comparative Study. *Haematologica*. 1998;83(4):298-304.
161. Pettersson M, Jernberg-Wiklund H, Larsson LG, et al. Expression of the bcl-2 gene in human multiple myeloma cell lines and normal plasma cells. *Blood*. 1992;79(2):495-502.
162. Touzeau C, Le Gouill S, Mahe B, et al. Deep and sustained response after venetoclax therapy in a patient with very advanced refractory myeloma with translocation t(11;14). *Haematologica*. 2017;102(3):e112-e114.
163. Moreau P, Chanan-Khan A, Roberts AW, et al. Promising efficacy and acceptable safety of venetoclax plus bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory MM. *Blood*. 2017;130(22):2392-2400.
164. Niesvizky R, Lentzsch S, Badros AZ, et al. A Phase I Study of PD 0332991: Complete CDK4/6 Inhibition and Tumor Response In Sequential Combination with Bortezomib and Dexamethasone for Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2010;116(21):860.
165. Raje N, Kumar S, Hideshima T, et al. Seliciclib (CYC202 or R-roscovitine), a small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitor, mediates activity via down-regulation of Mcl-1 in multiple myeloma. *Blood*. 2005;106(3):1042-1047.
166. Stewart AK, Vij R, Laubach JP, Hofmeister CC, Hagerty R, Dueck AC, et al. Phase I Study of Aurora Kinase Inhibitor MLN8237 and Bortezomib in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2012;120(21):1895.
167. Lonial S, Shah JJ, Zonder J, Bensinger W.I., Cohen A.D., Kaufman JL, et al. Prolonged Survival and Improved Response Rates With ARRY-520 In Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM) Patients With Low α -1 Acid Glycoprotein (AAG) Levels: Results From a Phase 2 Study. *Blood*. 2013;122(21):285.

168. Shah JJ, Kaufman JL, Zonder JA, et al. A Phase 1 and 2 study of Filanesib alone and in combination with low-dose dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma. *Cancer*. 2017;123(23):4617-4630.
169. Ocio EM, Mitsiades CS, Orłowski RZ, Anderson KC. Future agents and treatment directions in multiple myeloma. *Expert Rev Hematol*. 2014;7(1):127-141.
170. Blangy A, Lane HA, d'Herin P, Harper M, Kress M, Nigg EA. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell*. 1995;83(7):1159-1169.
171. Sarli V and Giannis A. Targeting the kinesin spindle protein: basic principles and clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2008;14(23):7583-7587.
172. Stern BM and Murray AW. Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr Biol*. 2001;11(18):1462-1467.
173. Milross CG, Mason KA, Hunter NR, Chung WK, Peters LJ, Milas L. Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(18):1308-1314.
174. Tunquist BJ, Woessner RD, Walker DH. Mcl-1 stability determines mitotic cell fate of human multiple myeloma tumor cells treated with the kinesin spindle protein inhibitor ARRY-520. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(7):2046-2056.
175. Boiani M, Daniel C, Liu X, Hogarty MD, Marnett LJ. The stress protein BAG3 stabilizes Mcl-1 protein and promotes survival of cancer cells and resistance to antagonist ABT-737. *J Biol Chem*. 2013;288(10):6980-6990.
176. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 2005;435(7042):677-681.
177. Chari A, Htut M, Zonder JA, et al. A phase 1 dose-escalation study of filanesib plus bortezomib and dexamethasone in patients with recurrent/refractory multiple myeloma. *Cancer*. 2016;122(21):3327-3335.

178. Shah J, Feng L, Thomas S, Weber D, Wang M, Manasanch E. Phase 1 Study of the Novel Kinesin Spindle Protein Inhibitor Filanesib + Carfilzomib in Patients with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma (RRMM). *Blood*. 2015;126:376;.
179. Zonder J, Usmani S, Scott E, Hofmaister C, Lendvai N, Berdeja J. Phase 2 study of carfilzomib (CFZ) with or without filanesib (FIL) in patients with advanced multiple myeloma (MM). *Blood*. 2015;126:728.
180. 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(2):698-705.
181. 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.
182. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, et al. Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood*. 2006;107(3):1092-1100.
183. 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):e34914.
184. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J*. 1995;9(13):1277-1287.
185. 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;72:248-254.
186. Poltz R and Naumann M. Dynamics of p53 and NF-kappaB regulation in response to DNA damage and identification of target proteins suitable for therapeutic intervention. *BMC Syst Biol*. 2012;6:125-0509-6-125.
187. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*. 2010;70(2):440-446.

188. Hanamura I, Huang Y, Zhan F, Barlogie B, Shaughnessy J. Prognostic value of cyclin D2 mRNA expression in newly diagnosed multiple myeloma treated with high-dose chemotherapy and tandem autologous stem cell transplantations. *Leukemia*. 2006;20(7):1288-1290.
189. Zhan F, Barlogie B, Arzoumanian V, et al. Gene-expression signature of benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood*. 2007;109(4):1692-1700.
190. Chen L, Wang S, Zhou Y, et al. Identification of early growth response protein 1 (EGR-1) as a novel target for JUN-induced apoptosis in multiple myeloma. *Blood*. 2010;115(1):61-70.
191. Cao X, Deng X, May W. Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax. *Blood*. 2003;102(7):2605-14.
192. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J, Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 2005;106(1):296-303.
193. Rosenthal A, Kumar S, Hofmeister C, et al. A Phase Ib Study of the combination of the Aurora Kinase Inhibitor Alisertib (MLN8237) and Bortezomib in Relapsed Multiple Myeloma. *Br J Haematol*. 2016;174(2):323-325.
194. Woessner R, Tunquist B, Lemieux C, et al. ARRY-520, a novel KSP inhibitor with potent activity in hematological and taxane-resistant tumor models. *Anticancer Res*. 2009;29(11):4373-4380.
195. Kim KH, Xie Y, Tytler EM, Woessner R, Mor G, Alvero AB. KSP inhibitor ARRY-520 as a substitute for Paclitaxel in Type I ovarian cancer cells. *J Transl Med*. 2009;7:63-5876-7-63.
196. Carter BZ, Mak DH, Woessner R, et al. Inhibition of KSP by ARRY-520 induces cell cycle block and cell death via the mitochondrial pathway in AML cells. *Leukemia*. 2009;23(10):1755-1762.

197. LoRusso PM, Goncalves PH, Casetta L, et al. First-in-human phase 1 study of filanesib (ARRY-520), a kinesin spindle protein inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. 2015;33(2):440-449.
198. Khoury HJ, Garcia-Manero G, Borthakur G, et al. A phase 1 dose-escalation study of ARRY-520, a kinesin spindle protein inhibitor, in patients with advanced myeloid leukemias. *Cancer*. 2012;118(14):3556-3564.
199. Lonial S and Nooka AK. Novel combination approaches for myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015:286-293.
200. Jackson JR, Patrick DR, Dar MM, Huang PS. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):107-117.
201. San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, et al. A new staging system for multiple myeloma based on the number of S-phase plasma cells. *Blood*. 1995;85(2):448-455.
202. Greipp PR, Lust JA, O'Fallon WM, Katzmann JA, Witzig TE, Kyle RA. Plasma cell labeling index and beta 2-microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood*. 1993;81(12):3382-3387.
203. Fabian P, Kren L, Nenutil R. Determination proliferative activity of myeloma cells in histologic material. *Cesk Patol*. 2004;40(2):46-49.
204. Garcia-Sanz R, Gonzalez-Fraile MI, Mateo G, et al. Proliferative activity of plasma cells is the most relevant prognostic factor in elderly multiple myeloma patients. *Int J Cancer*. 2004;112(5):884-889.
205. Leizerman I, Avunie-Masala R, Elkabets M, Fich A, Gheber L. Differential effects of monastrol in two human cell lines. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(16):2060-2070.

206. Chin GM and Herbst R. Induction of apoptosis by monastrol, an inhibitor of the mitotic kinesin Eg5, is independent of the spindle checkpoint. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(10):2580-2591.
207. Purcell JW, Davis J, Reddy M, et al. Activity of the kinesin spindle protein inhibitor ispinesib (SB-715992) in models of breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(2):566-576.
208. Liu M, Aneja R, Liu C, et al. Inhibition of the mitotic kinesin Eg5 up-regulates Hsp70 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in multiple myeloma cells. *J Biol Chem.* 2006;281(26):18090-18097.
209. Knox JJ, Gill S, Synold TW, et al. A phase II and pharmacokinetic study of SB-715992, in patients with metastatic hepatocellular carcinoma: a study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG IND.168). *Invest New Drugs.* 2008;26(3):265-272.
210. Lee CW, Belanger K, Rao SC, et al. A phase II study of ispinesib (SB-715992) in patients with metastatic or recurrent malignant melanoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial. *Invest New Drugs.* 2008;26(3):249-255.
211. Nijhawan D, Fang M, Traer E, et al. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* 2003;17(12):1475-1486.
212. Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature.* 2003;426(6967):671-676.
213. Ferlini C, Cicchillitti L, Raspaglio G, et al. Paclitaxel directly binds to Bcl-2 and functionally mimics activity of Nur77. *Cancer Res.* 2009;69(17):6906-6914.
214. Vijapurkar U, Wang W, Herbst R. Potentiation of kinesin spindle protein inhibitor-induced cell death by modulation of mitochondrial and death receptor apoptotic pathways. *Cancer Res.* 2007;67(1):237-245.

215. Haschka MD, Soratroi C, Kirschnek S, et al. The NOXA-MCL1-BIM axis defines lifespan on extended mitotic arrest. *Nat Commun.* 2015;6:6891.
216. Wang P, Lindsay J, Owens TW, et al. Phosphorylation of the proapoptotic BH3-only protein bid primes mitochondria for apoptosis during mitotic arrest. *Cell Rep.* 2014;7(3):661-671.
217. Tao W, South VJ, Diehl RE, et al. An inhibitor of the kinesin spindle protein activates the intrinsic apoptotic pathway independently of p53 and de novo protein synthesis. *Mol Cell Biol.* 2007;27(2):689-698.
218. Tao W, South VJ, Zhang Y, et al. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell.* 2005;8(1):49-59.
219. Humphries MJ, Anderson D, Williams L, Rieger R, Tunquist B, Walker D. ARRY-520 combined with pomalidomide displays enhanced anti-tumor activity in preclinical models of multiple myeloma. *Blood.* 2013;122(21):3167.
220. Ocio EM, Motllo C, Rodriguez-Otero P, Martinez-Lopez J, Jesús Martín J, Blade J. Safety and Efficacy of Filanesib in Combination with Pomalidomide and Dexamethasone in Refractory MM Patients. Phase Ib/II Pomdefil Clinical Trial Conducted By the Spanish MM Group. *Blood.* 2017;130:1873.
221. Clute P and Pines J. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol.* 1999;1(2):82-87.
222. Nam HJ and van Deursen JM. Cyclin B2 and p53 control proper timing of centrosome separation. *Nat Cell Biol.* 2014;16(6):538-549.
223. Belpaire FM and Bogaert MG. Pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences of altered binding of drugs to alpha 1-acid glycoprotein. *Prog Clin Biol Res.* 1989;300:337-350.
224. Piafsky KM and Borga O. Plasma protein binding of basic drugs. II. Importance of alpha 1-acid glycoprotein for interindividual variation. *Clin Pharmacol Ther.* 1977;22(5 Pt 1):545-549.

225. Piafsky KM. Disease-induced changes in the plasma binding of basic drugs. *Clin Pharmacokinet.* 1980;5(3):246-262.
226. Baumann H and Gauldie J. Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol Biol Med.* 1990;7(2):147-159.
227. Piver MS, Moyer M, Diakun K, Lele SB, Chu TM. Serum alpha 1-acid glycoprotein in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 1988;29(3):305-308.
228. San Miguel J, Vicente V, Battle J, Hernandez F, Lopez Borrascas A. Acute phase reactants and clinical stages in multiple myeloma. *Neoplasma.* 1981;28(3):333-338.
229. Tunquist B, Brown K, Hingorani G. Identification of alpha 1-acid glycoprotein (AAG) as a potential patient selection biomarker for improved clinical activity of the novel KSP inhibitor ARRY-520 in relapsed and refractory multiple myeloma (MM). *Blood.* 2012;120:1868.
230. Schisterman EF, Perkins NJ, Liu A, Bondell H. Optimal cut-point and its corresponding Youden Index to discriminate individuals using pooled blood samples. *Epidemiology.* 2005;16(1):73-81.
231. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer.* 1950;3(1):32-35.
232. Khalil HA, ElKhatib MAW, Belal TS, El-Yazbi AF, Hamdy DA. Hyperlipidemia Alters the Pharmacokinetics of Posaconazole and Vincristine Upon Co-Administration in Rats. *Drugs R D.* 2017;17(2):287-296.
233. Ishizaki J, Fukaishi A, Fukuwa C, et al. Evaluation of selective competitive binding of basic drugs to alpha1-acid glycoprotein variants. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(1):95-99.
234. Kremer JM, Wilting J, Janssen LH. Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Rev.* 1988;40(1):1-47.

235. Cheresch DA, Distasio JA, Vogel CL, Lopez DM. Mitogen-induced blastogenesis and receptor mobility inhibition by breast cancer serum with elevated orosomucoid (alpha 1-acid glycoprotein) levels. *J Natl Cancer Inst.* 1982;68(5):779-783.
236. Blain PG, Mucklow JC, Rawlins MD, Roberts DF, Routledge PA, Shand DG. Determinants of plasma alpha 1-acid glycoprotein (AAG) concentrations in health. *Br J Clin Pharmacol.* 1985;20(5):500-502.
237. Harshman S, Reynolds VH, Neumaster T, Patikas T, Worrall T. The prognostic significance of serial seromuroid analyses in patients with cancer. *Cancer.* 1974;34(2):291-299.
238. Ganz PA, Baras M, Ma PY, Elashoff RM. Monitoring the therapy of lung cancer with alpha-1-acid glycoprotein. *Cancer Res.* 1984;44(11):5415-5421.
239. Ganz PA, Shell WE, Tokes ZA. Evaluation of a radioimmunoassay for alpha 1-acid glycoprotein to monitor therapy of cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 1983;71(1):25-30.
240. Suarez Nieto C, Cuesta Garcia A, Fernandez Bustillo E, Mendez Colunga JC, Alvarez Marcos C. Serum glycoproteins and prognosis in cancer of the head and neck. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1986;11(1):41-45.
241. Pelliniemi TT, Irjala K, Mattila K, et al. Immunoreactive interleukin-6 and acute phase proteins as prognostic factors in multiple myeloma. Finnish Leukemia Group. *Blood.* 1995;85(3):765-771.
242. Gabay C and Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340(6):448-454.
243. Banks RE, Forbes MA, Storr M, et al. The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. *Clin Exp Immunol.* 1995;102(1):217-223.
244. Elg SA, Mayer AR, Carson LF, Twiggs LB, Hill RB, Ramakrishnan S. Alpha-1 acid glycoprotein is an immunosuppressive factor found in ascites from ovaria carcinoma. *Cancer.* 1997;80(8):1448-1456.

245. Van Oss CJ, Gillman CF, Bronson PM, Border JR. Phagocytosis-inhibiting properties of human serum alpha-1 acid glycoprotein. *Immunol Commun.* 1974;3(4):321-328.
246. Timoshenko AV, Bovin NV, Shiyan SD, Vakhrushev SY, Andre S, Gabius HJ. Modification of the functional activity of neutrophils treated with acute phase response proteins. *Biochemistry (Mosc).* 1998;63(5):546-550.
247. Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1482(1-2):157-171.
248. Shiyan SD and Bovin NV. Carbohydrate composition and immunomodulatory activity of different glycoforms of alpha1-acid glycoprotein. *Glycoconj J.* 1997;14(5):631-638.
249. Kagaya N, Kamiyoshi A, Tagawa Y, et al. Suppression of cell death in primary rat hepatocytes by alpha1-acid glycoprotein. *J Biosci Bioeng.* 2005;99(1):81-83.
250. Gillis AM, Yee YG, Kates RE. Binding of antiarrhythmic drugs to purified human alpha 1-acid glycoprotein. *Biochem Pharmacol.* 1985;34(24):4279-4282.
251. 255. Eap CB, Cuendet C, Baumann P. Selectivity in the binding of psychotropic drugs to the variants of alpha-1 acid glycoprotein. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1988;337(2):220-224.
252. Gambacorti-Passerini C, Zucchetti M, Russo D, et al. Alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res.* 2003;9(2):625-632.
253. Ohbatake Y, Fushida S, Tsukada T, et al. Elevated alpha1-acid glycoprotein in gastric cancer patients inhibits the anticancer effects of paclitaxel, effects restored by co-administration of erythromycin. *Clin Exp Med.* 2016;16(4):585-592.

254. Gesink-van der Veer BJ, Burm AG, Vletter AA, Bovill JG. Influence of Crohn's disease on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of alfentanil. *Br J Anaesth.* 1993;71(6):827-834.
255. Tatman AJ, Wrigley SR, Jones RM. Resistance to atracurium in a patient with an increase in plasma alpha 1 globulins. *Br J Anaesth.* 1991;67(5):623-625.
256. Kays MB, White RL, Gatti G, Gambertoglio JG. Ex vivo protein binding of clindamycin in sera with normal and elevated alpha 1-acid glycoprotein concentrations. *Pharmacotherapy.* 1992;12(1):50-55.
257. Niewiarowski S, Lukasiewicz H, Nath N, Tai Sha A. Inhibition of human platelet aggregation by dipyridamole and two related compounds and its modification by acid glycoproteins of human plasma. *J Lab Clin Med.* 1975;86(1):64-76.
258. Arredondo G, Calvo R, Marcos F, Martinez-Jorda R, Suarez E. Protein binding of itraconazole and fluconazole in patients with cancer. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1995;33(8):449-452.
259. Abramson FP, Jenkins J, Ostchega Y. Effects of cancer and its treatments on plasma concentration of alpha 1-acid glycoprotein and propranolol binding. *Clin Pharmacol Ther.* 1982;32(5):659-663.
260. Aguirre C, Troconiz IF, Valdivieso A, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of penbutolol in healthy and cancer subjects: role of altered protein binding. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1996;92(1):53-72.
261. Bilello JA, Bilello PA, Stellrecht K, et al. Human serum alpha 1 acid glycoprotein reduces uptake, intracellular concentration, and antiviral activity of A-80987, an inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 protease. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(6):1491-1497.
262. Mey UJM, Renner C, von Moos R. Vemurafenib in combination with cobimetinib in relapsed and refractory extramedullary multiple myeloma harboring the BRAF V600E mutation. *Hematol Oncol.* 2017;35(4):890-893.

ANEXOS

The kinesin spindle protein inhibitor filanesib enhances the activity of pomalidomide and dexamethasone in multiple myeloma

Susana Hernández-García,¹ Laura San-Segundo,¹ Lorena González-Méndez,¹ Luis A. Corchete,¹ Irena Misiewicz-Krzeminska,^{1,2} Montserrat Martín-Sánchez,¹ Ana-Alicia López-Iglesias,¹ Esperanza Macarena Algarín,¹ Pedro Mogollón,¹ Andrea Díaz-Tejedor,¹ Teresa Paino,¹ Brian Tunquist,³ María-Victoria Mateos,¹ Norma C Gutiérrez,¹ Elena Díaz-Rodríguez,¹ Mercedes Garayoa^{1*} and Enrique M Ocio^{1*}

¹Centro Investigación del Cáncer-IBMCC (CSIC-USAL) and Hospital Universitario-IBSAL, Salamanca, Spain; ²National Medicines Institute, Warsaw, Poland and ³Array BioPharma, Boulder, Colorado, USA

*MG and EMO contributed equally to this work



Haematologica 2017
Volume 102(12):2113-2124

ABSTRACT

Kinesin spindle protein inhibition is known to be an effective therapeutic approach in several malignancies. Filanesib (ARRY-520), an inhibitor of this protein, has demonstrated activity in heavily pre-treated multiple myeloma patients. The aim of the work herein was to investigate the activity of filanesib in combination with pomalidomide plus dexamethasone backbone, and the mechanisms underlying the potential synergistic effect. The ability of filanesib to enhance the activity of pomalidomide plus dexamethasone was studied in several *in vitro* and *in vivo* models. Mechanisms of this synergistic combination were dissected by gene expression profiling, immunostaining, cell cycle and short interfering ribonucleic acid studies. Filanesib showed *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* synergy with pomalidomide plus dexamethasone treatment. Importantly, the *in vivo* synergy observed in this combination was more evident in large, highly proliferative tumors, and was shown to be mediated by the impairment of mitosis transcriptional control, an increase in monopolar spindles, cell cycle arrest and the induction of apoptosis in cells in proliferative phases. In addition, the triple combination increased the activation of the proapoptotic protein BAX, which has previously been associated with sensitivity to filanesib, and could potentially be used as a predictive biomarker of response to this combination. Our results provide preclinical evidence for the potential benefit of the combination of filanesib with pomalidomide and dexamethasone, and supported the initiation of a recently activated trial being conducted by the Spanish Myeloma group which is investigating this combination in relapsed myeloma patients.

Introduction

The use of novel agents has resulted in a clear improvement in the survival of multiple myeloma (MM) patients. However, most patients eventually relapse,¹ denoting the need for new drugs targeting key pathogenic mechanisms of the tumor plasma cell.² CYCLIN D deregulation is a common oncogenic event found in 98% of MM patients,³ and considerable effort has been expended in trying to identify agents targeting the cell cycle of myeloma cells. Examples of such molecules are seliciclib (an inhibitor of CDK4/CDK6)⁴ and AURORA KINASE inhibitors.⁵ Unfortunately, thus far these agents have not proved to be sufficiently effective or were stopped due to toxicity⁶ in myeloma patients, who subsequently continued MM disease development.

Filanesib (ARRY-520), a first-in-class⁷ kinesin spindle protein (KSP) inhibitor, is a novel agent targeting this same pathogenic area.⁸ KSP (EG5/KIF11) is a member of the mitotic kinesin family that is only expressed in dividing cells⁹ and is essential for establishing the mitotic bipolar spindle and ensuring centrosome separation.¹⁰

Correspondence:

emocio@usal.es

Received: March 13, 2017.

Accepted: August 29, 2017.

Pre-published: August 31, 2017.

doi:10.3324/haematol.2017.168666

Check the online version for the most updated information on this article, online supplements, and information on authorship & disclosures: www.haematologica.org/content/102/12/2113

©2017 Ferrata Storti Foundation

Material published in *Haematologica* is covered by copyright. All rights are reserved to the Ferrata Storti Foundation. Use of published material is allowed under the following terms and conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>. Copies of published material are allowed for personal or internal use. Sharing published material for non-commercial purposes is subject to the following conditions: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>, sect. 3. Reproducing and sharing published material for commercial purposes is not allowed without permission in writing from the publisher.



Inhibition of KSP activity arrests cells in metaphase by forming aberrant monopolar spindles and impairing the separation of centrosomes.¹¹ The activity of filanesib is determined by two main factors: first, the integrity of components of the spindle checkpoint, which arrests cells when an alteration in mitosis is found, and second, the loss of anti-apoptotic signals¹² during mitotic blockade, particularly the decrease in the MCL-1 protein.¹³ This latter protein is essential for the survival of MM cells,^{13,14} therefore, myeloma cells might be particularly susceptible to filanesib treatment.¹² This agent has already been explored in MM in a phase II clinical trial, in which it gave a 16% response rate (\geq partial response (PR)) in heavily treated patients who had received all available agents and a median of six previous lines of therapy.⁷ This initial activity prompted the search for potential combinations that could enhance the activity of the current backbones of therapy in relapsed MM.

In this context, pomalidomide in combination with dexamethasone induces a 30% overall response rate and prolongs overall survival by up to one year in patients already exposed to immunomodulatory drugs (IMiDs) and proteasome inhibitors and refractory to the last line of therapy.^{15,16} However, novel partners for combination with this doublet are currently being sought, with the aim of improving these results.

In the present study we evaluated the preclinical anti-myeloma activity of the triple combination of pomalidomide+dexamethasone+filanesib (PDF). Preliminary data reported synergy of filanesib with pomalidomide in a xenograft mouse model.¹⁷

Herein, we demonstrate that filanesib is a good partner for combination with all IMiDs plus dexamethasone, the combination with pomalidomide being particularly potent in the dexamethasone sensitive MM.1S cell line, and very effective in a large panel of other MM cell lines. This synergistic effect is partly mediated by an increase in monopolar spindle formation and the simultaneous upregulated expression and activation of the proapoptotic protein BAX in actively proliferating myeloma cells. These findings supported the ongoing clinical trial (*clinicaltrials.gov* Identifier: 02384083) conducted by the Spanish MM group to evaluate the safety and efficacy of this triple combination in relapsed/refractory MM patients.

Methods

(For more specific information see the [Online Supplementary File](#))

Reagents and drugs

Filanesib was provided by Array BioPharma Inc. (Boulder, CO, USA). Thalidomide, lenalidomide and pomalidomide were purchased from Selleckchem (Houston, TX, USA), dexamethasone from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and bortezomib from LC Laboratories (Woburn, MA, USA).

MM cell lines, patient samples and cultures

Origin, authentication and *in vitro* growth conditions of MM cell lines have already been characterized.^{18,19} The study of the activity in the presence of interleukin (IL)-6, insulin-like growth factor (IGF)-1 or co-culture with stroma was performed as described.^{20,21} Bone marrow (BM) samples from MM patients were obtained following institutional approval and written informed consent.

Cell viability, cell cycle and apoptosis assays

Cell viability of MM cells was evaluated by the MTT assay.²² The cell cycle profile, apoptosis induction and mitochondrial membrane potential was analyzed by flow as described.²¹ *In vitro* synergism was quantitated using CalcuSyn software²³ (Biosoft, Ferguson, MO, USA) *via* a constant ratio drug combination design. *Ex vivo* analysis of apoptosis in freshly isolated patient cells. Cytometry analyses of apoptosis in BM tumor plasma cells and lymphocytes were performed as described.²⁴

Immunofluorescence study

MM.1S cells treated for 24h were fixed, blocked and incubated overnight with a primary anti- α -tubulin antibody (Sigma) and counterstained with Alexa Fluor 488 conjugated anti-mouse immunoglobulin G (IgG) secondary antibody (Life Technologies, Waltham, MA, USA) and a 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) solution (Sigma).

Western blot

All procedures were performed as described.²⁴ All antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA) except for anti-MCL-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-CYTOCHROME C (Calbiochem, Billerica, MA, USA) and Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

Gene silencing with siRNA

MM.1S cells were transiently transfected with either 100 nM non-targeting control short interfering RNA (NT-siRNA) or 100 nM ON TARGET plus SMART pool siRNA targeting human BAX (BAX-siRNA; Dharmacon, Lafayette, CO, USA) using the Nucleofector II system (Lonza, Allendale, NJ, USA).

Animal models

The human subcutaneous plasmacytoma model in CB17-severe combined immunodeficiency (SCID) mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) was used as described.^{21,25} Animal experiments were conducted with permission from the local Ethical Committee for Animal Experimentation.

Histological and immunohistochemistry (IHC) analyses

This technique has been previously described²⁵ using an anti-BAX antibody (Cell Signaling, Boston, MA, USA) and the EnVision anti-mouse/rabbit peroxidase complexes (Dako, Glostrup, Denmark). Peroxidase activity was identified using the 3,3'-diaminobenzidine MAPO system (Ventana Medical Systems, Roche, Tucson, AZ, USA). Sections were counterstained with hematoxylin and analyzed by standard light microscopy.

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) was performed using the *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany). Sections were counterstained with DAPI and visualized by confocal laser microscopy (Leica TCS SP2).

RNA isolation, cDNA synthesis and microarray hybridization and analysis

Tumors and MM.1S cells (n=3 for each treatment) were hybridized in Human Gene 2.0 ST arrays (Affymetrix) following manufacturer's instructions. The raw intensity data were pre-processed using the RMA algorithm²⁶ implemented in the Affymetrix Expression Console, version 1.4.1.46. Differentially expressed genes were identified using the significance analysis of microarrays (SAM) algorithm,²⁷ version 4.01, selecting genes with q value <0.05. Microarray data are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository database (Accession number GSE94341).

Table 1. The most significant biological processes which were deregulated with the treatments.

| <i>In vitro</i> | PD | | F | | PDF | |
|--|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| | Adjusted <i>P</i> | Genes in GO dataset | Adjusted <i>P</i> | Genes in GO dataset | Adjusted <i>P</i> | Genes in GO dataset |
| Biological Processes Common to PD, F, and PDF | | | | | | |
| mitotic cell cycle process | 1.85E-19 | 258 | 3.55E+00 | 3 | 5.18E-27 | 283 |
| mitotic cell cycle phase transition | 5.29E-15 | 162 | 1.19E+00 | 3 | 1.59E-15 | 166 |
| cell cycle phase transition | 1.35E-14 | 168 | 1.34E+00 | 3 | 4.80E-15 | 172 |
| Biological Processes Common to PD and PDF | | | | | | |
| ncRNA metabolic process | 2.72E-30 | 211 | – | – | 3.45E-23 | 199 |
| RNA processing | 8.19E-31 | 293 | – | – | 1.10E-21 | 274 |
| rRNA processing | 9.22E-21 | 114 | – | – | 2.66E-19 | 113 |
| DNA replication | 1.98E-24 | 126 | – | – | 6.87E-19 | 118 |
| DNA metabolic process | 4.04E-22 | 290 | – | – | 4.25E-15 | 273 |
| Biological Processes Exclusive to PD | | | | | | |
| protein targeting | 6.36E-03 | 162 | – | – | – | – |
| regulation of DNA recombination | 7.51E-03 | 26 | – | – | – | – |
| mRNA-containing ribonucleoprotein. complex export from nucleus | 1.66E-02 | 36 | – | – | – | – |
| mRNA export from nucleus | 1.66E-02 | 36 | – | – | – | – |
| DNA replication checkpoint | 1.96E-02 | 12 | – | – | – | – |
| Biological Processes Exclusive to PDF | | | | | | |
| mitotic sister chromatid segregation | – | – | – | – | 9.07E-06 | 53 |
| nuclear chromosome segregation | – | – | – | – | 2.43E-04 | 84 |
| metaphase plate congression | – | – | – | – | 7.02E-03 | 23 |
| mitotic metaphase plate congression | – | – | – | – | 1.33E-02 | 19 |
| establishment of chromosome localization | – | – | – | – | 1.96E-02 | 28 |
| <i>In vivo</i> | | | | | | |
| | PD Adjusted <i>P</i> | F Genes in GO dataset | PDF Adjusted <i>P</i> | Genes in GO dataset | Adjusted <i>P</i> | Genes in GO dataset |
| Biological Processes Common to PD and PDF | | | | | | |
| mitotic cell cycle process | 2.45E+00 | 13 | – | – | 3.34E-02 | 20 |
| Biological Processes exclusive to PD | | | | | | |
| G1/S transition of mitotic cell cycle | 2.11E-03 | 8 | – | – | – | – |
| regulation of peptidase activity | 1.44E-02 | 9 | – | – | – | – |
| integrin-mediated signaling pathway | 3.23E-02 | 5 | – | – | – | – |
| regulation of cell protein metab. process | 4.19E-02 | 23 | – | – | – | – |
| regulation of protein metab. process | 4.34E-02 | 24 | – | – | – | – |
| Biological Processes exclusive to PDF | | | | | | |
| nuclear division | – | – | – | – | 4.02E-05 | 21 |
| cell migration | – | – | – | – | 3.67E-03 | 27 |
| sterol biosynthetic process | – | – | – | – | 3.95E-03 | 6 |
| secondary alcohol metab. proc. | – | – | – | – | 4.17E-03 | 8 |
| sterol metabolic process | – | – | – | – | 6.80E-03 | 8 |
| mitotic nuclear division | – | – | – | – | 9.05E-03 | 14 |
| regulation of nervous system | – | – | – | – | 9.91E-03 | 20 |
| alcohol biosynthetic process | – | – | – | – | 1.17E-02 | 7 |
| mitotic cell cycle phase transition | – | – | – | – | 1.42E-02 | 15 |
| nervous system development | – | – | – | – | 1.65E-02 | 39 |
| brain development | – | – | – | – | 2.00E-02 | 18 |
| cholesterol metabolic process | – | – | – | – | 2.08E-02 | 7 |
| regulation of viral gen. replic. | – | – | – | – | 2.40E-02 | 6 |
| cell cycle phase transition | – | – | – | – | 2.48E-02 | 15 |
| regulation of nuclear division | – | – | – | – | 2.56E-02 | 8 |
| metaphase plate congression | – | – | – | – | 2.73E-02 | 5 |
| animal organ development | – | – | – | – | 3.22E-02 | 50 |

List of the most significant ontological categories of biological processes (level 5 in the GO classification) in functional enrichment analysis (DAVID) for deregulated genes in either MM.1S cells or mouse tumors treated with PD, F and PDF. The number of deregulated genes for each treatment is represented in Venn diagrams (Figure 2C, D). Terms of the significant biological processes, Benjamini-Hochberg adjusted *P*-value, and the number of genes present in each category are shown. Biological processes related to mitosis are shaded in blue. PD: pomalidomide+dexamethasone; F: filanesib; PDF: pomalidomide+dexamethasone+filanesib; GO: Gene Ontology; RNA: ribonucleic acid; G1/S: Gap 1/synthesis.

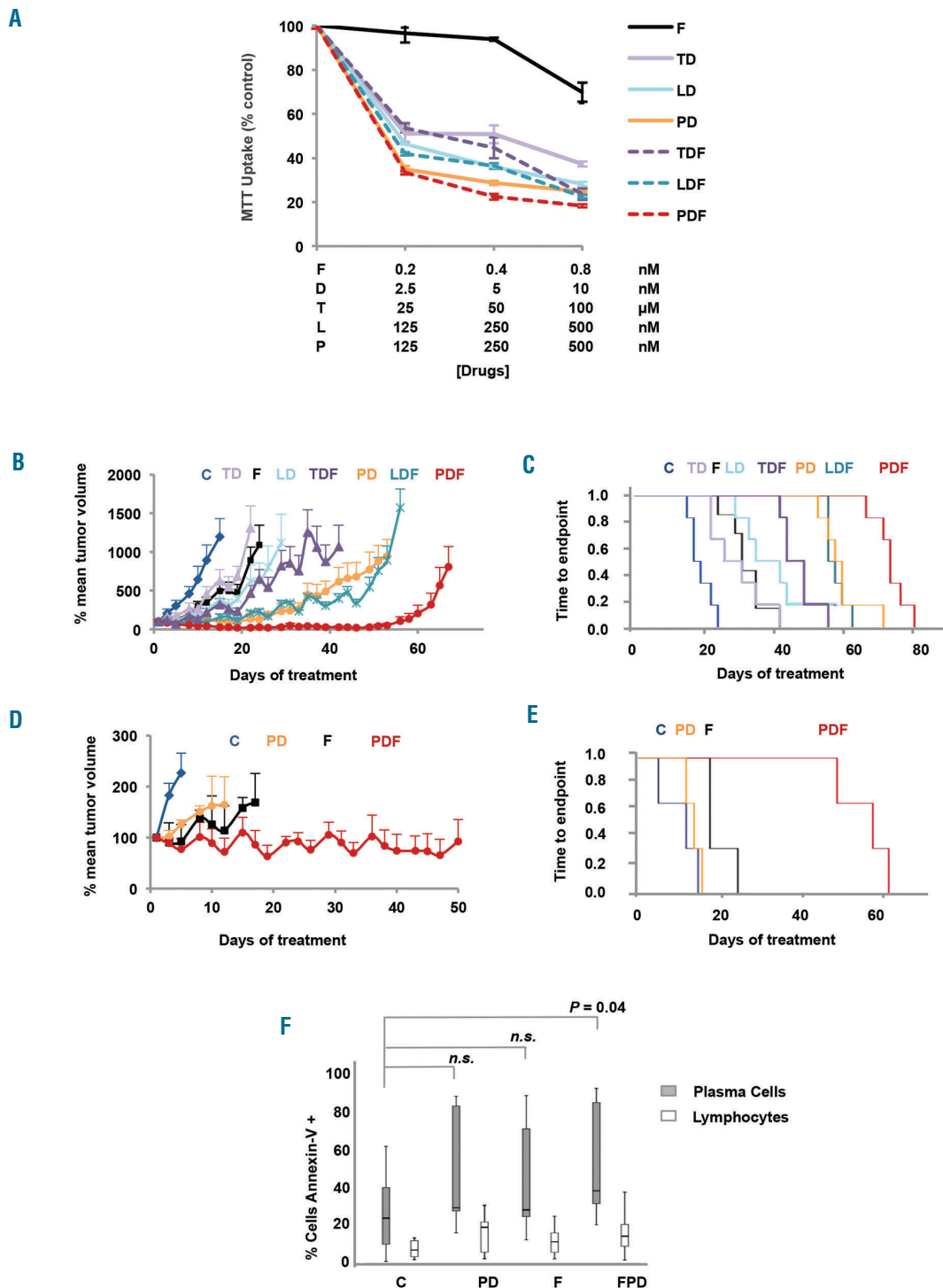


Figure 1. IMiDs, especially pomalidomide and dexamethasone, strongly synergized with filanesib. A) Cell viability of MM.1S cells treated with F plus TD, LD, PD, or the triple combination for 48h. Results are shown as the percentage of control. Data are summarized as the mean \pm SD (n=3). Combination indexes (CI) for the combination of filanesib and each of the IMiDs together with dexamethasone are shown in *Online Supplementary Figure S1B & S1D*. Tumor growth curves of SCID mice randomized and treated when their tumors became palpable (B; small plasmacytomas; mean volume around 125 mm³; range 30 - 237; n=6 per group) or reached a substantial volume (D; large plasmacytomas; mean volume around 2500 mm³; range 1617 - 3134; n=3 per group) at the moment of treatment initiation. Experimental groups included: C (vehicle control; intraperitoneal injection (i.p.) 5 days per week), F (10 mg/kg i.p., 2 days per week), D (0.5 mg/kg i.p., 2 days per week), T (50 mg/kg i.p., 5 days per week), L (25 mg/kg i.p., 5 days per week), and P (8 mg/kg i.p., 5 days per week) in monotherapy or in double or triple combination. Data are summarized as the mean \pm SEM. C & E) Analysis of survival by Kaplan-Meier estimator from mice with (C) small or (E) large tumors. F) BM cells from 9 MM patients incubated with P 500 nM, D 10 nM and F 1 nM alone and in the different combinations for 48h. Apoptosis induction was analyzed by Annexin-V staining by flow cytometry assay, both in plasma cells and lymphocytes that were identified based on the surface expression of CD38 and CD45, respectively. A statistically significant difference ($P < 0.05$) was found between plasma cells treated with PDF and control. Error bars indicate the last "non-outlier" value at each side. F: filanesib; D: dexamethasone; T: thalidomide; L: lenalidomide; P: pomalidomide; n.s.: not significant.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics v.21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Results

Filanesib potentiates the anti-myeloma activity of pomalidomide in combination with dexamethasone

Firstly, the ability of filanesib (F) to enhance the activity of the different IMiDs in combination with dexamethasone (D) was evaluated. MM.1S cells were treated for 48h with different doses of thalidomide + dexamethasone (TD), lenalidomide + dexamethasone (LD) or pomalidomide + dexamethasone (PD), with or without different concentrations of filanesib, and viability was analyzed by MTT assay (Figure 1A). All IMiDs + dexamethasone had a synergistic effect with filanesib, with combination indexes (CIs) in the synergistic range (most synergic CIs of 0.112, 0.103, and 0.063 for TDF, LDF and PDF, respective-

ly; *Online Supplementary Figure S1*). However, the most effective combination was that of F with PD (Figure 1A).

This potentiation was also maintained *in vivo* in a subcutaneous plasmacytoma model, as filanesib enhanced the effect of TD, LD and PD in terms of delay in tumor growth (Figure 1B). In this regard, the PDF combination was particularly potent, as the addition of low doses of filanesib significantly reduced the mean tumor volume from day 26 of treatment compared with the standard of care PD. Moreover, the triple combination of PDF completely controlled tumor growth for up to 50 days. PDF was also superior to the other two tested combinations, TDF and LDF (Student's *t*-test, $P < 0.05$, from days 8 and 10 of treatment, respectively). The tumor growth control observed with PDF translated into a statistically significant improvement in the survival of treated mice, with a median survival (CI 95%) of 74 (71-76) days for PDF compared with 56 (55-61) days for mice treated with the standard backbone PD (log-rank test, $P = 0.004$; Figure 1C). The survival analysis also favored PDF over the other IMiD com-

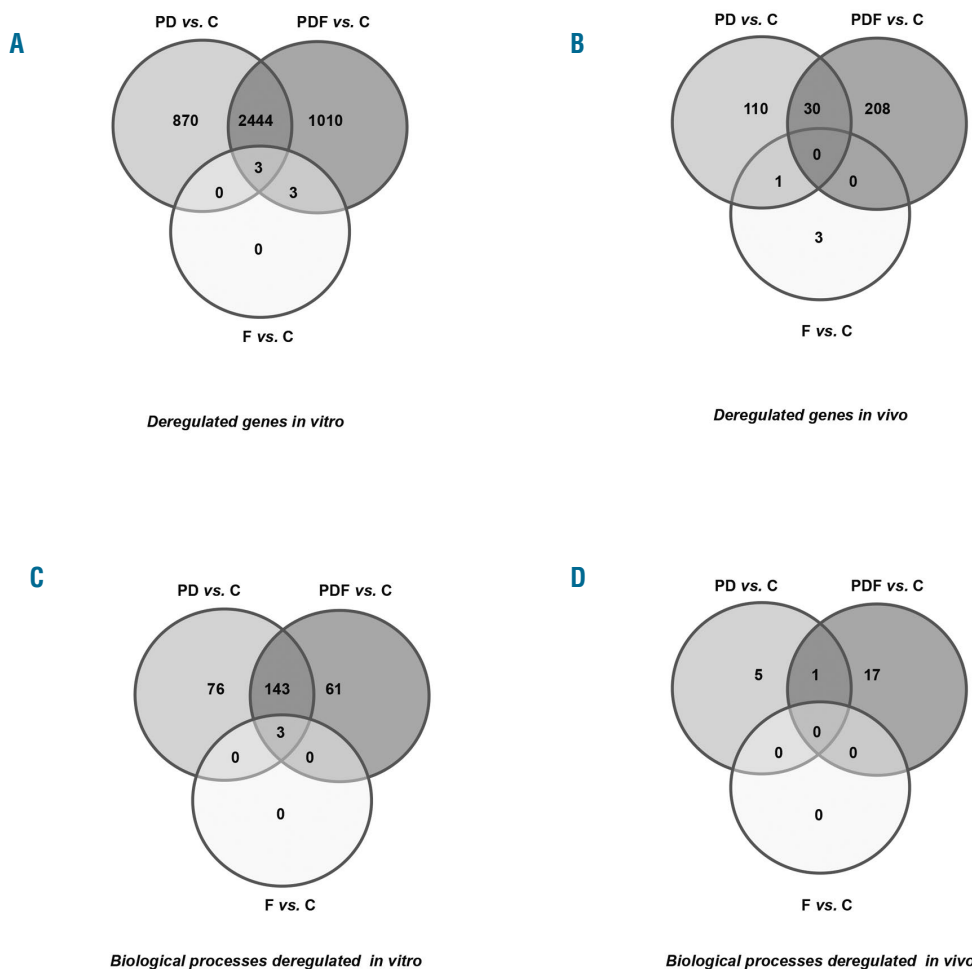


Figure 2. Effect of PD, F and PDF treatments on gene expression profiles. A & B) Venn diagrams of significantly deregulated genes in MM.1S cells (A) or tumors from mice (B) after treatment with PD, F and PDF vs. control. C & D) Venn diagrams of the biological processes (Gene Ontology at level 5) deregulated by the PD, F and PDF treatments vs. control in *in vitro* (C) and *in vivo* (D) studies. A list of the most significant biological processes deregulated in the *in vitro* and *in vivo* studies is shown in Table 1; only processes from level 5 Gene Ontology categories (the most specific processes) were considered, in order to avoid redundancy. P: pomalidomide; D: dexamethasone; F: filanesib; C: control.

binations (log-rank test, $P < 0.001$ for PDF compared with TDF and LDF; Figure 1C). As filanesib exerts its activity on dividing cells, the PDF combination could be particularly active in highly proliferative cells. Therefore, we assessed the effect of PDF on mice bearing large plasmacytomas growing in the exponential phase. PDF was able to control these rapidly progressing tumors (Figure 1D), and there

was also a statistically significant advantage with respect to the reduction of tumor volume compared with filanesib in monotherapy from day 15, and from day 5 when compared with the PD double combination (Student's *t*-test, $P < 0.05$). As shown in Figure 1E, there was a noticeable improvement in median survival (CI 95%), from 14 (11-17) and 18 (18-18) days for PD and F, respectively, to 59

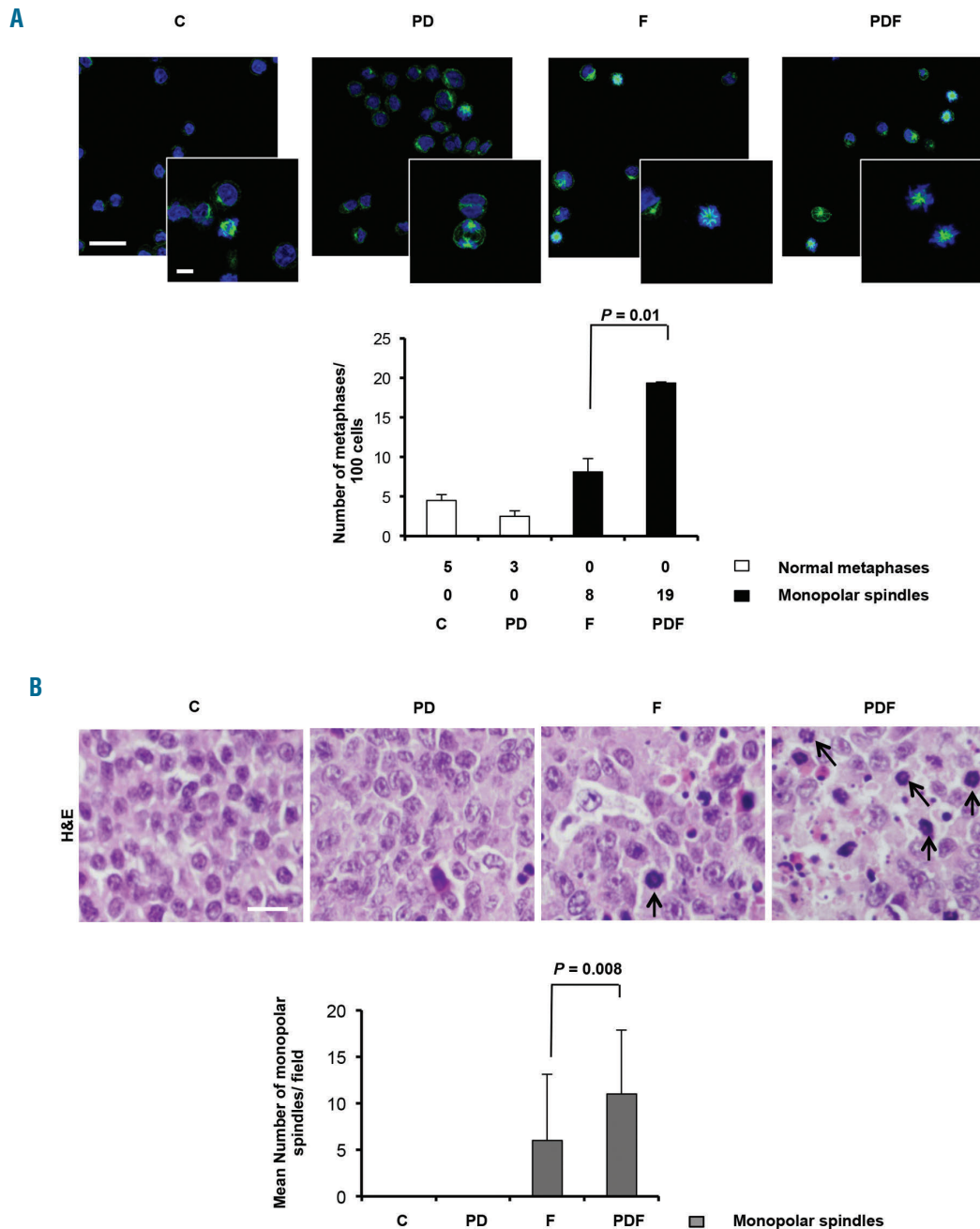


Figure 3. PDF boosted the formation of monopolar spindles A) Quantitative determination of monopolar spindles in MM.1S cells treated with the vehicle (control), PD, F or PDF for 24h. Representative micrographs showing cells immunostained with anti-tubulin antibody (shown in green) to visualize microtubules and DAPI (blue) to evidence nuclei using confocal microscopy. Bar = 15 μ m in lower magnification micrograph; bar = 5 μ m in higher magnification insert). Data are presented as the mean \pm SD of two independent experiments. Statistical significance was evaluated with Student's *t*-test. B) Evaluation of monopolar spindles in paraffin sections of tumors from mice treated with vehicle (control=C), PD, F or PDF for two days and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Thirty high-power fields (600x) were evaluated for each experimental condition (3 mice per condition). Monopolar spindles were characterized by chromosomes stained with hematoxylin (in purple) orientated in a ring. Bar = 10 μ m). Data are presented as the mean \pm SD. Statistical significance was evaluated with Student's *t*-test. P: pomalidomide; D: dexamethasone; F: filanesib.

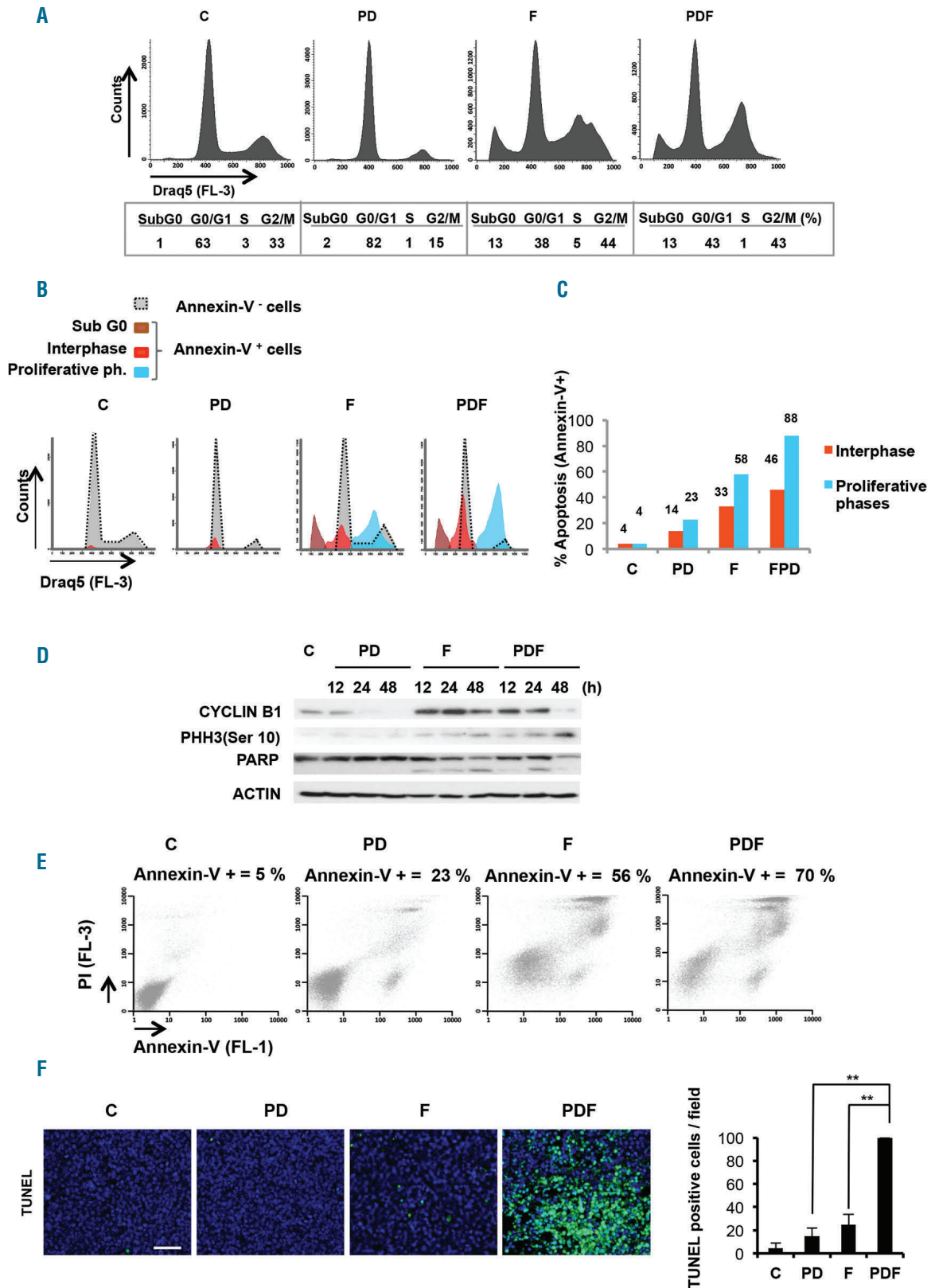


Figure 4. PDF triggered cell cycle arrest and apoptosis of MM cells in pro-liferative phases. (A) Analysis of cell cycle by flow cytometry in MM.1S cells treated with the vehicle (control=C), PD, F or PDF for 48h after Draq5 staining (Draq5 binds to DNA from both living and non-living cells). B) Simultaneous analysis of cell cycle profile and apoptosis induction in MM.1S cells treated with C, PD, F or PDF for 48h by flow cytometry after Draq5/Annexin-V staining. C) Percentage of apoptotic cells in each phase of the cell cycle was also calculated. Data shown is for a representative experiment that was repeated at least twice. D) Western blot analysis of cell cycle proteins CYCLIN B1, phosphorylated HH3 and PARP in MM.1S cells treated with indicated conditions for 12h to 48h. E) Apoptosis induction in MM.1S cells treated with C, PD, F or PDF for 48h and analyzed by flow cytometry after staining with Annexin-V. F) Micrographs of tumor sections from mice treated for two days with C, PD, F or PDF and histochemically stained with TUNEL assay. Quantitative determination of TUNEL-positive cells (30 630x fields per experimental condition, 3 mice per condition). Data are expressed as the mean \pm SD (n=3); ** P <0.01 (Student's t -test). P: pomalidomide; D: dexamethasone; F: filanesib.

(45-73) days for animals treated with PDF (log-rank test, $P < 0.05$ for all comparisons). It is remarkable that PDF was able to improve the survival of these end-stage mice by almost two months. With regard to toxicity, the PDF triple combination was well tolerated by mice in the initial experiment, and the effect was not worse than that of PD alone. In mice with large plasmacytomas, treatment induced a moderate decrease in body weight (not reaching 20%), which was recovered on the days without treatment, and which was partly due to the poor clinical condition of the mice (*Online Supplementary Figure S2*).

Based on this data and the fact that the combination with pomalidomide and dexamethasone is particularly appealing in the clinical setting, we decided to expand our study of this combination in MM. First, its synergy was evaluated in some additional MM cell lines; MM144, JJN3, RPMI8226-LR5 and OPM-2; showing CIs in the synergistic range (*Online Supplementary Figure S3*). The potent anti-myeloma effect of the PDF triple combination was maintained in the presence of IGF-1 or IL-6, two important factors in the myeloma BM microenvironment. Additionally, the PDF combination was also effective when the MM.1S cells were co-cultured with either human mesenchymal stromal cells from myeloma patients (BMSCs) or the human mesenchymal stromal line (hMSC-TERT) (*Online Supplementary Figure S4*).

The effect of PDF was further evaluated *ex vivo* in BM aspirates of nine MM patients. Both filanesib alone as well as pomalidomide and dexamethasone were active in these patients. However, only the triple combination demonstrated a statistically significant difference when compared with the control (C) untreated cells (PDF vs. C, $P = 0.04$; Figure 1F). Moreover, there was a clear therapeutic window, as the toxicity on the lymphocytes of these same patients was clearly lower.

It is of note that although the efficacy of the triple combination PDF was observed *in vitro* in several MM cell lines as well as in patients samples, its benefit over LDF or TDF was only explored in a single cell line.

The PDF combination deregulates genes necessary for mitosis

In order to investigate the mechanism of action of the triple combination, changes induced by the different treatments in the gene expression profiles of MM.1S cells *in vitro* or in tumors from treated mice were analyzed and compared with their respective untreated controls. In both studies, whereas filanesib alone induced a minimal genomic deregulation with respect to the control (6 and 4 genes significantly deregulated in the *in vitro* and *in vivo* experiments, respectively), treatment with PDF enhanced the effect of PD, particularly in the *in vivo* study (3460 vs. 3317 and 238 vs. 141 deregulated genes in the *in vitro* and *in vivo* studies, respectively; Figure 2A,B. See *Online Supplementary Table S1* and *Table S2* for differentially deregulated genes in the PDF combination *in vitro* and *in vivo*, respectively. A complete list of the 3460 genes deregulated *in vitro* is also provided as a supplement). Due to the variety of functions in which these genes were involved, a functional enrichment analysis was performed in order to identify the biological processes most significantly affected by the deregulated genes following exposure to PD, F and PDF treatments in both experiments (see Table 1 and Venn diagrams for biological processes in Figure 2C,D). Three biological processes were commonly

deregulated by all treatments in the *in vitro* experiments (while no common process was discovered in the *in vivo* experiment), and all of them were related to mitosis and cell cycles (Table 1). Of interest, the top five biological processes exclusively deregulated in the PDF combination *in vitro* were involved in different stages of mitosis; in line with this, five out of the 17 biological processes uniquely altered in the PDF treatment *in vivo* were also associated with mitosis and nuclear division (see shaded processes in Table 1).

Next, we selected those genes deregulated in the triple combination *in vitro* which were involved in mitotic and cell cycle processes (*Online Supplementary Table S3*). Of note, *CCNB1* and *CCNB2*, encoding for B-type cyclins and being major regulators of the G2/M transition of cell cycle, are upregulated in the PDF treatment. The upregulated expression of *PSMD3*, a 26S proteasome subunit, and *NEK2*, involved in the anaphase promoting complex and centrosomal separation, may also be mediating the increased mitotic and cell cycle progression processes in this combination. Similarly, *CDC25C* and *CDC25B*, required for entry into mitosis, show an increased expression in the PDF combination.

The PDF combination enhances the formation of aberrant monopolar spindles

One mechanism underlying the synergy of the triple combination could be the enhancement of the ability of filanesib to block mitosis and to induce monopolar spindles, the characteristic sequelae of KSP inhibition. To test this hypothesis, the formation of aberrant monopolar spindles was evaluated after a 24h treatment of MM.1S cells with vehicle, F, PD or PDF. Whereas the majority of untreated cells and those exposed to PD displayed normal mitoses with typical bipolar spindles, almost all F- and PDF-treated cells that were in mitosis showed a monopolar spindle phenotype (Figure 3A). Interestingly, and differentiating these latter two conditions, treatment with the triple combination increased the percentage of cells in mitosis, which resulted in a significant increase in the absolute number of monopolar spindles (0, 0, 8 and 19 aberrant spindles per 100 cells, for the control, PD, F and PDF, respectively ($P = 0.01$ for the F vs. PDF comparison) (Figure 3A). These results were confirmed *in vivo* by immunohistochemistry, since no aberrant monopolar spindles were found in the control and PD-treated tumors, while F and PDF displayed an average of 6 and 11 monopolar spindles per field ($P = 0.008$ for the F vs. PDF comparison; Figure 3B).

PDF causes cell cycle arrest in G2/M phases and specifically induces apoptosis in cells arrested in proliferative phases

The increase in mitotic cells observed with the triple combination was intriguing, and therefore its specific effect on the cell cycle profile of treated tumor cells was studied (Figure 4A). To check whether there was a particular susceptibility to apoptosis in cells at certain phases of the cell cycle, simultaneous staining with Draq5 and Annexin-V was performed (Figure 4B). The treatment with filanesib in monotherapy arrested cells in the proliferative phases of the cell cycle, with 49% of cells in synthesis (S) and gap 2 mitosis (G2-M) phases compared with 36% in control cells (two-tailed Student's *t*-test from three independent experiments $P = 0.03$). The PDF triple combi-

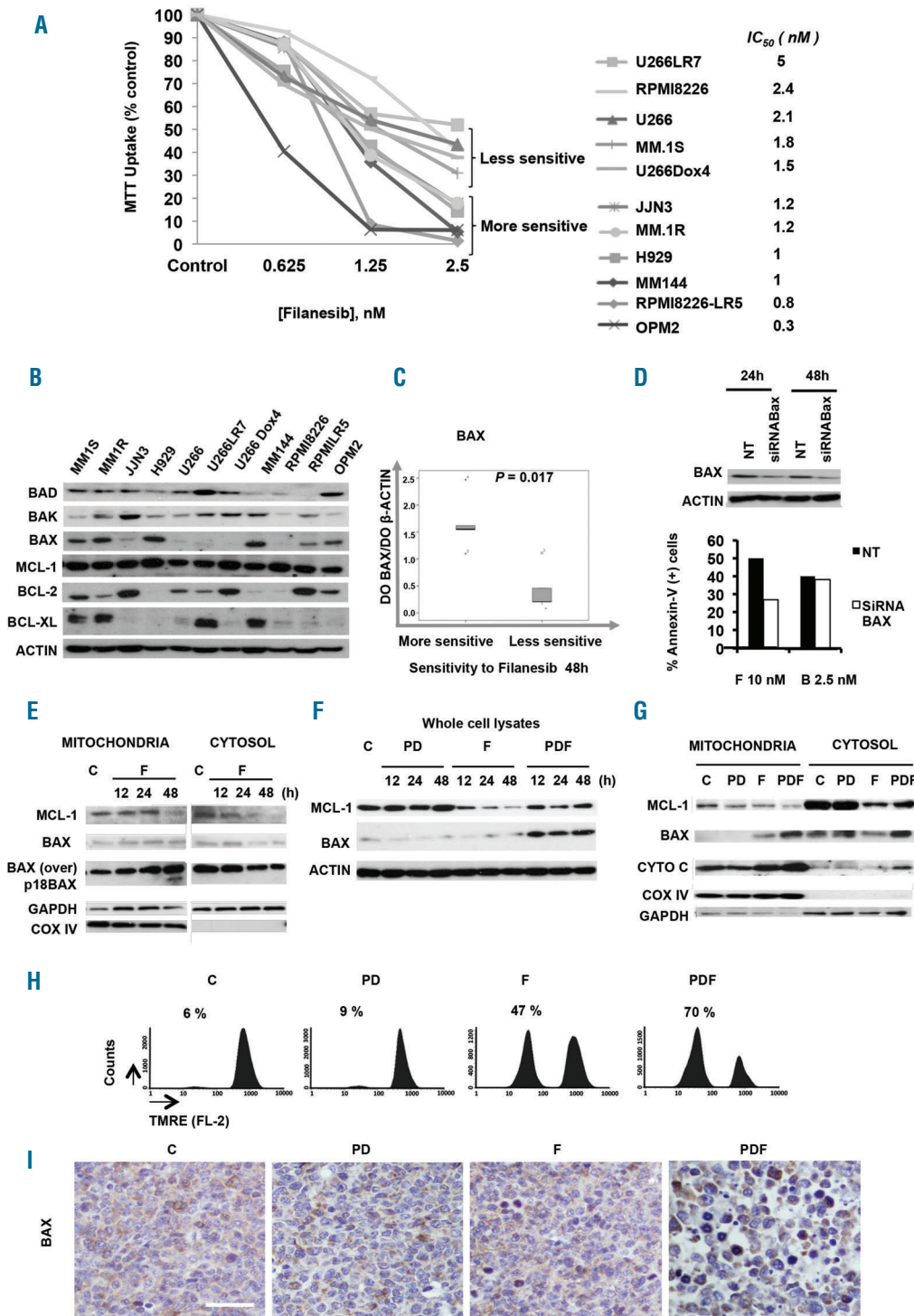


Figure 5. Role of the increase and activation of the proapoptotic protein BAX on the anti-myeloma efficacy of F and PDF treatments. (A) Cell viability of a panel of MM cell lines incubated with increasing concentrations of F for 48h and analyzed by MTT assay. Data are expressed as a percentage of control values. (B) Western blot analysis of basal levels of six BCL-2 family members (BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX, BAK, BAD) studied in the same MM cell lines. (C) Expression levels for BAX were determined by densitometry analysis of bands (using ImageJ software) and relative to those of β -ACTIN. Relation between the basal levels of BAX protein and drug sensitivity to F was calculated with respect to IC_{50} for 48h. Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney U test. (D) Immunoblot of MM.1S cells 24h and 48h after transfection with BAX-specific siRNA. Nontransfected cells (NT) were also analyzed for comparison. 24h after siRNA transfection, cells were treated with either filanesib (F) or bortezomib (B) for an additional 24h, and apoptosis was assessed by Annexin-V⁺ cells and evaluated by flow cytometry. (E) MM.1S cells were treated for 12-48h with 10 nM F, and expression levels of MCL-1 and BAX in the mitochondrial and cytosolic fractions were analyzed by western blot. COX IV and GAPDH expression were used as loading controls for mitochondrial and cytosolic, respectively. (F & G) Immunoblot of total (F), mitochondrial and cytosolic (G) extracts from MM.1S cells treated for 12-48h with the vehicle (control=C), PD, F or PDF for 48h. The expression of COX IV and GAPDH proteins were used as mitochondrial and cytosolic loading controls, respectively. (H) Analysis of mitochondrial membrane potential in MM.1S cells treated with different conditions as assessed by flow cytometry after TMRE staining. (I) Immunohistochemical staining of BAX in tumors from mice treated for two days under the indicated conditions. Bar = 20 μ m. In Figure E, "BAX over" indicates overexposure of the film to better visualize mild changes in the levels of this protein; "p18 BAX" indicates the proapoptotic 18 kDa BAX fragment. P: pomalidomide; D: dexamethasone.

nation did not show much difference in this regard compared with filanesib alone, with 44% of cells in G2-M arrest (Figure 4A). However, treatment with filanesib specifically induced apoptosis of cells in G2-M phases with 58% of them being apoptotic compared with only 33% in non-proliferating phases (Figure 4B,C). This fact was significantly enhanced in the triple combination as most apoptotic cells (88%) were seen to be in proliferative phases (G2 or M) (Figure 4B,C). In order to confirm these findings, various cell cycle markers were biochemically analyzed. MM.1S cells treated with filanesib and the triple combination showed an accumulation of CYCLIN B1 levels at 12h and 24h as shown by western blot, this being indicative of the activation of the spindle assembly checkpoint (SAC),²⁸ which correlated with the percentage of cells arrested in G2-M phases. In contrast to treatment with filanesib, CYCLIN B1 levels rapidly decreased after 48h in the PDF combination, possibly indicating an attempt of the cells to exit from mitosis.^{29,30} However, they proved unable to do so, as after 48h cells treated with PDF died in mitosis *via* apoptosis, as shown by an increase in phosphorylated histone H3 protein levels, a marker of mitotic cells,³¹ and PARP cleavage and degradation³² (Figure 4D).

The increase in apoptotic induction was confirmed by Annexin-V/IP staining, as treatment of MM.1S with both PD and filanesib for 48h induced an increase of Annexin-V-positive cells (23% and 56%, respectively) compared with the control (5%), and this effect was much greater with the triple combination (70% apoptosis; Figure 4E). In the same manner, the TUNEL assay of treated tumors revealed a significant increase in apoptotic cells in the triple combination compared with filanesib or PD alone (Figure 4F).

Anti-myeloma efficacy of filanesib in monotherapy depends on the levels of both the anti-apoptotic protein MCL-1 and the proapoptotic protein BAX

To gain insight into the mechanism underlying the enhanced apoptotic response in dividing cells with PDF treatment, key molecular features associated with sensitivity to filanesib alone were investigated. A dose response to filanesib at 48h in 11 cell lines showed that, although all of them were sensitive to this agent, some cell lines were more sensitive to filanesib treatment, with almost no viable cells at 2.5 nM (Figure 5A). Other cells, however, had higher IC₅₀ values and 30-50% of cells remained viable even at higher doses of the drug (Figure 5A). Given that the sensitivity to filanesib has previously been correlated with levels of MCL-1, the basal expression of six representative BCL-2 family members was evaluated in the same panel of MM cell lines showing different patterns of expression (Figure 5B). No correlation was observed between MCL-1 expression and filanesib sensitivity. However, the sensitivity to filanesib showed a direct correlation with basal expression levels of BAX, as shown in Figure 5C ($P < 0.05$), whereby cell lines with higher basal BAX levels were particularly sensitive to this agent. In contrast, no correlation was observed between BAX expression and sensitivity to the proteasome inhibitor bortezomib, which we used here as a control (Online Supplementary Figure S5). To confirm the role of BAX in filanesib-induced cell death, MM.1S cells were transfected with BAX-specific siRNA. BAX knockdown induced resistance to filanesib treatment, reducing the

number of apoptotic cells by half (Figure 5D). A similar effect related to BAX levels was observed in OPM-2 cells (*data not shown*).

Moreover, subcellular fractionation studies indicated that treatment with filanesib triggered the translocation of BAX from the cytoplasm to the mitochondria, where it was cleaved into the very potent proapoptotic 18 kDa fragment³³ (Figure 5E). Simultaneously, the levels of the prosurvival protein MCL-1 also decreased in both subcellular compartments (Figure 5E). These findings suggest the potential importance of the modulation of both BAX and MCL-1 protein levels in filanesib-induced apoptosis.

The PDF triple combination induces augmented expression and activation of BAX protein

Interestingly, and unlike filanesib alone, MCL-1 levels were not significantly affected after treatment with PDF. In contrast, two events were clearly potentiated in the triple combination compared with filanesib alone: first, PDF induced the expression of total BAX levels *in vitro* (Figure 5F), and second, PDF enhanced the presence of this protein in the mitochondria, where it exerts its apoptotic activity (Figure 5G). This event led to the permeabilization of the external mitochondrial membrane, resulting in the release of the apoptogenic factor CYTOCHROME C into the cytosol (Figure 5G), and an associated decrease in mitochondrial membrane potential, as observed by flow cytometry with tetramethylrhodamine, ethyl ester (TMRE; Figure 5H). Finally, *in vivo* experiments confirmed the PDF-induced BAX upregulation (Figure 5I).

Discussion

MM remains an incurable disease in most patients³⁴ and there is an urgent need for novel drugs to improve this situation. In the work herein, we have preclinically evaluated the combination of various IMiDs together with dexamethasone and filanesib, a novel KSP inhibitor that particularly affects dividing cells and depends on the survival protein MCL-1, which is essential for MM cell endurance.^{13,14} This novel therapeutic agent has already demonstrated an anti-myeloma effect with dexamethasone,⁷ and is currently being explored in combination with proteasome inhibitors.³⁵ Preliminary data have demonstrated synergy of filanesib with pomalidomide in a mouse xenograft model,¹⁷ and our *in vitro*, *ex vivo* and, notably, *in vivo* results clearly confirm this effect and provide evidence of the benefit of the addition of dexamethasone. This strong synergistic effect was confirmed in several MM cell lines, even in the presence of stromal cells. The potency of the combination with pomalidomide was shown to be better than those including thalidomide or lenalidomide, however, one limitation of the present study is that the advantages bestowed by PDF over TDF or LDF was only demonstrated in one cell line, that of MM.1S, particularly in the *in vivo* model. Nevertheless, taking into account that pomalidomide and dexamethasone is currently considered a backbone for combinations we decided to elaborate on this particular combination.

Since filanesib is an agent designed to interfere with the mechanisms of cell division, it is reasonable to think that it might be particularly effective in actively dividing cells. In line with this, the *in vivo* effect of the triple combination was particularly potent in mice bearing large tumors in the

exponential phase of growth. Interestingly, this combination resulted in an extended survival of almost two months, on average, in these end-stage mice. Analysis of the gene expression profile of both MM cells and PDF-treated tumors showed a substantial proportion of upregulated genes to be involved in the centrosome separation (*NEK2*), control of spindle assembly checkpoint (*CCNB1*, *CCNB2*) and entry into mitosis (*CDC25 C* and *CDC25 B*), implying that the triple combination significantly alters mitotic processes. Recently, the overexpression of *CCNB2* was associated with an acceleration in centrosome separation.³⁶ Based on these data, the antimyeloma effect of the triplet could be due to an increased mitosis and an increased monopolar spindle formation. In order to investigate this hypothesis, the phenotype of cells in metaphase was evaluated by immunohistochemistry. The triple combination induced an increase in the frequency of cells with an aberrant monopolar spindle phenotype compared with filanesib monotherapy. Accordingly, we demonstrated that the PDF combination generated the same degree of G2-M arrest as did filanesib alone, but the combination provoked a substantially more specific apoptosis of these cells when arrested in proliferative phases. A delicate balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic members of the BCL-2 family and their subcellular localization generally determines the fate of proliferative cells treated with anti-mitotic agents.³⁷⁻⁴⁰ In particular, it has been reported that apoptosis is enhanced by the activation of BAX in cancer cells using other KSP inhibitors.^{41,42} Accordingly, silencing BAX prompted cell survival under filanesib treatment in monotherapy. In line with this, PDF treatment induced increased apoptosis in proliferative phases that was associated with a significantly higher expression of

the proapoptotic BAX protein, promoting its activation. In parallel with these results, the tumors of mice treated with PDF also showed higher immunoreactivity for BAX. Moreover, we detected a release of the apoptogenic factor CYTOCHROME C into the cytosol, possibly due to permeabilization of the mitochondrial membrane induced by BAX. These experiments suggest that the expression levels and activation of BAX are crucial in determining the fate of MM cells treated with PDF.

In conclusion, we report the strong synergy of the PDF triple combination *in vitro* and especially *in vivo* in preclinical models of MM. The activity of PDF relies on the induction of monopolar spindles and arrest in mitosis, characterized by primary activation of SAC; increased apoptosis in these mitosis-arrested cells is characterized by the increased expression and activation of BAX, which could be a useful predictive biomarker of response to PDF in MM. These results support the phase II clinical trial POMDEFIL, which is currently being conducted by the Spanish MM group to evaluate this combination in refractory MM patients.

Funding

This work was funded in part by Array BioPharma, by the Spanish ISCIII-FIS (PI 15/0067 and PI 15/2156) and FEDER, the Spanish RTICC (RD12/0036/0058), Spanish Association Against Cancer (AECC, GCB120981SAN) and the Regional Council of Castilla y León (GRS 1029/A/14, GRS 1175/A/15 and FIC335U14).

Acknowledgments

The authors thank Phil Mason for his help in reviewing the English language of our manuscript.

References

- Kumar SK, Lee JH, Lahuerta JJ, et al. Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: a multi-center international myeloma working group study. *Leukemia*. 2012;26(1):149-157.
- Ocio EM, Richardson PG, Rajkumar SV, 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.
- Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J, Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 2005; 106(1):296-303.
- Niesvizky R, Lentzsch S, Badros AZ, et al. A phase I study of PD 0332991: complete CDK4/6 inhibition and tumor response in sequential combination with bortezomib and dexamethasone for relapsed and refractory multiple myeloma. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2010; 116(21):860.
- Rosenthal A, Kumar S, Hofmeister C, et al. A phase Ib study of the combination of the aurora kinase inhibitor alisertib (MLN8237) and bortezomib in relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2016; 174(2):323-325.
- Kollareddy M, Zheleva D, Dzubak P, Brahmshatriya PS, Lepsik M, Hajdich M. Aurora kinase inhibitors: progress towards the clinic. *Invest New Drugs*. 2012; 30(6):2411-2432.
- Lonial S, Shah JJ, Zonder J, Bensinger, W.I., Cohen AD, Kaufman JL, et al. Prolonged survival and improved response rates with ARRY-520 in relapsed/refractory multiple myeloma (RRMM) patients with low α -1 acid glycoprotein (AAG) levels: results from a phase 2 study. *Blood*. 2013; 122(21):285.
- Ocio EM, Mitsiades CS, Orlowski RZ, Anderson KC. Future agents and treatment directions in multiple myeloma. *Expert Rev Hematol*. 2014;7(1):127-141.
- Jackson JR, Patrick DR, Dar MM, Huang PS. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):107-117.
- Blangy A, Lane HA, d'Herin P, Harper M, Kress M, Nigg EA. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation *in vivo*. *Cell*. 1995;83(7):1159-1169.
- Stem BM, Murray AW. Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr Biol*. 2001; 11(18):1462-1467.
- Tunquist BJ, Woessner RD, Walker DH. Mcl-1 stability determines mitotic cell fate of human multiple myeloma tumor cells treated with the kinesin spindle protein inhibitor ARRY-520. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(7):2046-2056.
- Peperzak V, Vikstrom I, Walker J, et al. Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nat Immunol*. 2013;14(3):290-297.
- Zhang B, Gojo I, Fenton RG. Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood*. 2002;99(6):1885-93.
- San Miguel J, Weisel K, Moreau P, et al. Pomalidomide plus low-dose dex-amethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(11):1055-1066.
- Dimopoulos MA, Palumbo A, Corradini P, et al. An updated analysis of the STRATUS trial (MM-010): safety and efficacy of pomalidomide plus low-dose dexamethasone (POM + LoDEX) in patients (Pts) with relapsed/refractory multiple myeloma (RRMM). *Blood*. 2015;126(23):4225.
- Humphries MJ, Anderson D, Williams L, Rieger R, Tunquist B, Walker D. ARRY-520 combined with pomalidomide displays enhanced anti-tumor activity in preclinical models of multiple myeloma. *Blood*. 2013;122(21):3167.
- Paino T, Garcia-Gomez A, Gonzalez-Mendez L, et al. The novel pan-PIM kinase inhibitor, PIM447, displays dual antimyelo-

- ma and bone-protective effects, and potently synergizes with current standards of care. *Clin Cancer Res.* 2017;23(1):225-238.
19. Herrero AB, San Miguel J, Gutierrez NC. Deregulation of DNA double-strand break repair in multiple myeloma: implications for genome stability. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121581.
 20. Garcia-Gomez A, Quwaider D, Canavese M, et al. Preclinical activity of the oral proteasome inhibitor MLN9708 in Myeloma bone disease. *Clin Cancer Res.* 2014;20(6):1542-1554.
 21. 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.
 22. Paino T, Sarasquete ME, Paiva B, et al. Phenotypic, genomic and functional characterization reveals no differences between CD138++ and CD138low sub-populations in multiple myeloma cell lines. *PLoS One.* 2014;9(3):e92378.
 23. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 2010;70(2):440-446.
 24. Maiso P, Carvajal-Vergara X, Ocio EM, et al. The histone deacetylase inhibitor LBH589 is a potent antimyeloma agent that overcomes drug resistance. *Cancer Res.* 2006;66(11):5781-5789.
 25. 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.
 26. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(4):e15.
 27. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(9):5116-5121.
 28. Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(5):379-393.
 29. Pines J. Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(7):427-438.
 30. Murray A. Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell.* 1995;81(2):149-152.
 31. Schimming TT, Grabellus F, Roner M, et al. pHH3 immunostaining improves interobserver agreement of mitotic index in thin melanomas. *Am J Dermatopathol.* 2012;34(3):266-269.
 32. 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.
 33. Cao X, Deng X, May W. Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax. *Blood.* 2003;102(7):2605-2614.
 34. Barlogie B, Mitchell A, van Rhee F, Epstein J, Morgan GJ, Crowley J. Curing myeloma at last: defining criteria and providing the evidence. *Blood.* 2014;124(20):3043-3051.
 35. Shah JJ, Thomas S, Weber DM, Wang M, Orlowski R. Novel kinesin spindle protein inhibitor ARRY-520 + carfilzomib(Car) in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma (RRMM). *Haematologica.* 2013;98(S1):Abstract-S579.
 36. Nam HJ, van Deursen JM. Cyclin B2 and p53 control proper timing of centrosome separation. *Nat Cell Biol.* 2014;16(6):538-549.
 37. Ferlini C, Cicchillitti L, Raspaglio G, et al. Paclitaxel directly binds to Bcl-2 and functionally mimics activity of Nur77. *Cancer Res.* 2009;69(17):6906-6914.
 38. Vijapurkar U, Wang W, Herbst R. Potentiation of kinesin spindle protein inhibitor-induced cell death by modulation of mitochondrial and death receptor apoptotic pathways. *Cancer Res.* 2007;67(1):237-245.
 39. Haschka MD, Soratroi C, Kirschnek S, et al. The NOXA-MCL1-BIM axis defines lifespan on extended mitotic arrest. *Nat Commun.* 2015;6:6891.
 40. Wang P, Lindsay J, Owens TW, et al. Phosphorylation of the proapoptotic BH3-only protein bid primes mitochondria for apoptosis during mitotic arrest. *Cell Rep.* 2014;7(3):661-671.
 41. Tao W, South VJ, Zhang Y, et al. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly check-point and mitotic slippage. *Cancer Cell.* 2005;8(1):49-59.
 42. Tao W, South VJ, Diehl RE, et al. An inhibitor of the kinesin spindle protein activates the intrinsic apoptotic pathway independently of p53 and de novo protein synthesis. *Mol Cell Biol.* 2007;27(2):689-698.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and drugs. Filanesib (F) was provided by Array BioPharma Inc. (Boulder, CO, USA). Thalidomide (T), lenalidomide (L) and pomalidomide (P) were purchased from Selleckchem (Houston, TX, USA), dexamethasone (D) from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and bortezomib from LC Laboratories (Woburn, MA, USA). Generic chemicals were acquired from Sigma Chemical Co., Roche Biochemicals (Mannheim, Germany), Merck & Co., Inc. (Darmstadt, Germany).

MM cell lines, patient samples and cultures. Origin, authentication and *in vitro* growth conditions of human MM cell lines have already been characterized (17, 18). The study of drug activity in the presence of IL-6, IGF-1 or in co-culture with primary bone marrow mesenchymal stromal cells (BMSCs) or the human mesenchymal stromal cell line (hMSC-TERT) was performed as described previously (19, 20).

Cell viability, cell cycle and apoptosis assays. Cell viability of MM cells after exposure to drugs was evaluated by the MTT assay (21). The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of the drug or drug combination was calculated using SigmaPlot graphing software. The cell cycle profile, apoptosis induction and mitochondrial membrane potential were evaluated using the Annexin V-FITC / Propidium iodide kit provided by Immunostep (Salamanca, Spain), Draq5 from Biostatus (Leicestershire, UK) and tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) from Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA), following the manufacturers' instructions. Cell acquisition and data analysis were performed as previously described (20).

Quantification of *in vitro* synergism. Synergism was evaluated using CalcuSyn

Supplementary Tables

Supplementary Table 1. List of the most (top 100) differentially deregulated genes for the PDF treatment *in vitro* vs the control condition ordered by q-value. Gene identification and fold change with respect to control are given (78/100 genes were upregulated -red- and 22/100 were downregulated -green-).

| Position (by q-value) | Affimetrix probe set | Gene Symbol | Gene Title | Fold Change |
|-----------------------|----------------------|-----------------------------------|--|-------------|
| 1 | 16705961 | <i>DDIT4</i> | DNA-damage-inducible transcript 4 | 24,5686 |
| 2 | 17010760 | <i>NT5E</i> | 5'-nucleotidase, ecto (CD73) | 5,2666 |
| 3 | 17113362 | <i>CAPN6</i> | calpain 6 | 5,6308 |
| 4 | 16889636 | <i>BMPR2</i> | bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase) | 5,5188 |
| 5 | 16749583 | <i>FAR2</i> | fatty acyl CoA reductase 2 | 5,4656 |
| 6 | 16947173 | <i>MME</i> | membrane metallo-endopeptidase | 4,2176 |
| 7 | 17010354 | <i>CD109</i> | CD109 molecule | 5,5590 |
| 8 | 17018497 | <i>FKBP5</i> | FK506 binding protein 5 | 3,2047 |
| 9 | 16874339 | <i>RRAS</i> | related RAS viral (r-ras) oncogene homolog | 6,4109 |
| 10 | 16676693 | <i>PFKFB2</i> | 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2 | 3,6761 |
| 11 | 16904425 | <i>GRB14</i> | growth factor receptor-bound protein 14 | 3,2670 |
| 12 | 16833327 | <i>SLFN5</i> | schlafen family member 5 | 4,3888 |
| 13 | 16712086 | <i>ITGA8</i> | integrin, alpha 8 | -3,3440 |
| 14 | 16705011 | <i>DKK1</i> | dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 | 4,5034 |
| 15 | 17112349 | <i>CYSLTR1</i> | cysteinyl leukotriene receptor 1 | 5,3958 |
| 16 | 16662623 | <i>ZC3H12A</i> | zinc finger CCCH-type containing 12A | 3,2980 |
| 17 | 16897026 | <i>ZFP36L2</i> | ZFP36 ring finger protein-like 2 | 3,0419 |
| 18 | 16947715 | <i>SERPINI1</i> | serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1 | 4,2268 |
| 19 | 16676183 | <i>ATP2B4</i> | ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4 | 4,5334 |
| 20 | 16927283 | <i>USP41</i> | ubiquitin specific peptidase 41 | 3,4967 |
| 21 | 17012804 | <i>MYB</i> | v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian) | -2,8656 |
| 22 | 16807324 | <i>BMF</i> | Bcl2 modifying factor | 4,0062 |
| 23 | 16998850 | <i>EPB41L4A</i> | erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4A | 3,2604 |
| 24 | 16830577 | <i>CD68</i> /// <i>SNORA67</i> | CD68 molecule /// small nucleolar RNA, H/ACA box 67 | 2,7473 |
| 25 | 17024079 | <i>MAP3K5</i> | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 | 3,0983 |
| 26 | 17004167 | <i>IRF4</i> | interferon regulatory factor 4 | -2,5559 |
| 27 | 16673191 | <i>PBX1</i> | pre-B-cell leukemia homeobox 1 | 2,6468 |
| 28 | 17022529 | <i>WASF1</i> | WAS protein family, member 1 | 5,6603 |
| 29 | 16855898 | <i>CBLN2</i> | cerebellin 2 precursor | -5,6554 |

| | | | | |
|----|----------|---|--|---------|
| 30 | 17066083 | <i>PDGFRL</i> | platelet-derived growth factor receptor-like | 3,1682 |
| 31 | 16694617 | <i>IQGAP3</i> | IQ motif containing GTPase activating protein 3 | 3,2017 |
| 32 | 16799357 | <i>EIF2AK4</i> | eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4 | 2,3497 |
| 33 | 16881031 | <i>ANTXR1</i> | anthrax toxin receptor 1 | 3,4873 |
| 34 | 16843602 | <i>CCL3L3</i> | chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3 | -2,9111 |
| 35 | 17087588 | <i>MSANTD3</i> <i>///<i>TMEFF1</i></i> | Myb/SANT-like DNA-binding domain containing 3 /// transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1 | -2,5071 |
| 36 | 16881069 | <i>ANXA4</i> | annexin A4 | 2,8551 |
| 37 | 16804490 | <i>ISG20</i> | interferon stimulated exonuclease gene 20kDa | 2,6911 |
| 38 | 17062280 | <i>AASS</i> | aminoadipate-semialdehyde synthase | 2,9670 |
| 39 | 16715361 | <i>P4HA1</i> | prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I | 2,8670 |
| 40 | 16851427 | <i>CABLES1</i> | Cdk5 and Abl enzyme substrate 1 | -2,4560 |
| 41 | 16849349 | <i>TMC6</i> /// <i>TNRC6C-AS1</i> | transmembrane channel-like 6 /// TNRC6C antisense RNA 1 | 2,9446 |
| 42 | 16961806 | <i>GNB4</i> | guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4 | 2,4425 |
| 43 | 16963241 | <i>TFRC</i> | transferrin receptor (p90, CD71) | -2,2769 |
| 44 | 17078558 | <i>PAG1</i> | phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1 | 2,1537 |
| 45 | 16873007 | <i>ETHE1</i> | ethylmalonic encephalopathy 1 | 2,5653 |
| 46 | 16683445 | <i>FUCA1</i> | fucosidase, alpha-L- 1, tissue | 2,6554 |
| 47 | 17113147 | <i>TSC22D3</i> | TSC22 domain family, member 3 | 3,1506 |
| 48 | 16688339 | <i>WLS</i> | wntless homolog (Drosophila) | 2,1945 |
| 49 | 16718719 | <i>KIAA1598</i> | KIAA1598 | 2,4298 |
| 50 | 16781168 | <i>LOC440149</i> | uncharacterized LOC440149 | 2,9906 |
| 51 | 16933398 | <i>CRYBB1</i> | crystallin, beta B1 | -2,1842 |
| 52 | 16977052 | <i>CXCL10</i> | chemokine (C-X-C motif) ligand 10 | -4,4776 |
| 53 | 16706200 | <i>VCL</i> | vinculin | 2,7055 |
| 54 | 16982147 | <i>CCDC110</i> | coiled-coil domain containing 110 | -2,7509 |
| 55 | 16743091 | <i>FZD4</i> | frizzled family receptor 4 | 2,9608 |
| 56 | 16843578 | <i>CCL3</i> | chemokine (C-C motif) ligand 3 /// c-C motif chemokine 3-like | -2,4436 |
| 57 | 16690566 | <i>SORT1</i> | sortilin 1 | 2,2137 |
| 58 | 16676343 | <i>MDM4</i> | Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse) | 3,5764 |
| 59 | 16773662 | <i>ALOX5AP</i> | arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein | 2,9648 |
| 60 | 16732386 | <i>OAF</i> | OAF homolog (Drosophila) | -1,9394 |
| 61 | 17085760 | <i>MAMDC2</i> | MAM domain containing 2 | 2,2349 |
| 62 | 16938562 | <i>TGFBR2</i> | transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) | 2,3666 |
| 63 | 17086193 | <i>PSAT1</i> | phosphoserine aminotransferase 1 | -2,5800 |
| 64 | 16663033 | <i>SMAP2</i> | small ArfGAP2 | 2,1630 |
| 65 | 16849238 | <i>RHBDF2</i> | rhomoid 5 homolog 2 (Drosophila) | 2,4000 |
| 66 | 16944665 | <i>DTX3L</i> | deltex 3-like (Drosophila) | 2,3204 |
| 67 | 16749398 | <i>STK38L</i> | serine/threonine kinase 38 like | -2,2405 |
| 68 | 16834766 | <i>GRN</i> | granulin | 2,2726 |

| | | | | |
|-----|----------|--------------------------------|---|---------|
| 69 | 16862118 | <i>LGALS17A</i> | Charcot-Leyden crystal protein pseudogene | -3,1969 |
| 70 | 16836214 | <i>TOM1L1</i> | target of myb1 (chicken)-like 1 | 2,5848 |
| 71 | 16833876 | <i>GRB7</i> | growth factor receptor-bound protein 7 | 2,0959 |
| 72 | 16729128 | <i>SERPINH1</i> | serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, collagen binding protein 1 | 2,5906 |
| 73 | 16987531 | <i>ERAP2</i> | endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 | 2,0616 |
| 74 | 16668582 | <i>CD53</i> | CD53 molecule | 2,1044 |
| 75 | 16929529 | <i>TOM1</i> | target of myb1 (chicken) | 2,2001 |
| 76 | 16879721 | <i>EPAS1</i> | endothelial PAS domain protein 1 | 2,3965 |
| 77 | 16869643 | <i>GIPC1</i> | GIPC PDZ domain containing family, member 1 | 2,1892 |
| 78 | 16836528 | <i>YPEL2</i> | yippee-like 2 (Drosophila) | 2,2656 |
| 79 | 16836697 | <i>BCAS3</i> | breast carcinoma amplified sequence 3 | 2,0897 |
| 80 | 16903140 | <i>CXCR4</i> | chemokine (C-X-C motif) receptor 4 | 2,0658 |
| 81 | 16999245 | <i>PPIC</i> | peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C) | 2,1949 |
| 82 | 16692918 | <i>FAM63A</i> | family with sequence similarity 63, member A | 2,0728 |
| 83 | 16934045 | <i>PIK3IP1</i> | phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1 | 2,9113 |
| 84 | 16849379 | <i>TK1</i> | thymidine kinase 1, soluble | 2,0123 |
| 85 | 16834395 | <i>TUBG2</i> | tubulin, gamma 2 | 2,4750 |
| 86 | 16801557 | <i>CCNB2</i> | cyclin B2 | 1,9254 |
| 87 | 16716918 | <i>BLNK</i> | B-cell linker | 2,0808 |
| 88 | 16987125 | <i>POLR3G</i> | polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kD) | -2,5603 |
| 89 | 16825154 | <i>ARHGAP17</i> | Rho GTPase activating protein 17 | 2,2649 |
| 90 | 16769144 | <i>SYCP3</i> | synaptonemal complex protein 3 | -2,4411 |
| 91 | 17023658 | <i>MOXD1</i> | monooxygenase, DBH-like 1 | 2,5144 |
| 92 | 16903090 | <i>MCM6</i> | minichromosome maintenance complex component 6 | -2,0534 |
| 93 | 16687352 | <i>LRP8</i> | low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor | -2,2047 |
| 94 | 16841852 | <i>FLCN</i> /// <i>PLD6</i> | folliculin /// phospholipase D family, member 6 | -2,0191 |
| 95 | 16968735 | <i>HERC6</i> | HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6 | 2,2178 |
| 96 | 16674973 | <i>C1orf21</i> | chromosome 1 open reading frame 21 | 2,0368 |
| 97 | 16669796 | <i>TXNIP</i> | thioredoxin interacting protein /// thioredoxin-interacting protein-like | 2,3283 |
| 98 | 16875297 | <i>TMC4</i> | transmembrane channel-like 4 | 1,9228 |
| 99 | 16949759 | <i>HES1</i> | hairy and enhancer of split 1, (Drosophila) | -2,3674 |
| 100 | 16886564 | <i>FMNL2</i> | formin-like 2 | 2,3134 |

Supplementary Table 2. List of the most differentially deregulated genes for the PDF treatment in mouse tumors with respect to control tumors ordered by q-value. Gene identification and fold change with respect to control are given (44/100 genes were upregulated -red- and 56/100 were downregulated -green-).

| Position (by q-value) | Affimetrix probe set | Gene Symbol | Gene Title | Fold change |
|-----------------------|----------------------|-------------------------------------|---|-------------|
| 1 | 17061881 | <i>DOCK4</i> | dedicator of cytokinesis 4 | 2,4679 |
| 2 | 16797421 | <i>IGHG1</i> /// <i>IGHD2-21</i> | immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker) | -3,5417 |
| 3 | 16830202 | <i>XAF1</i> | XIAP associated factor 1 | 3,1376 |
| 4 | 16687618 | <i>DHCR24</i> | 24-dehydrocholesterol reductase | -2,4940 |
| 5 | 17104939 | <i>LOC100506745</i> | protein shisa-5-like | 1,6968 |
| 6 | 16944695 | <i>PARP14</i> | poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14 | 2,5951 |
| 7 | 17053892 | <i>INSIG1</i> | insulin induced gene 1 | -2,0825 |
| 8 | 16764758 | <i>GALNT6</i> | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (GalNAc-T6) | -1,6764 |
| 9 | 16691245 | <i>AMPD1</i> | adenosine monophosphate deaminase 1 | -2,6988 |
| 10 | 16761269 | <i>CLEC7A</i> | C-type lectin domain family 7, member A | 1,5083 |
| 11 | 16798919 | <i>ARHGAP11A</i> | Rho GTPase activating protein 11A | 1,7493 |
| 12 | 16785483 | <i>FUT8</i> /// <i>FUT8-AS1</i> | fucosyltransferase 8 (alpha (1,6) fucosyltransferase) /// FUT8 antisense RNA 1 | 1,4881 |
| 13 | 16693187 | <i>TDRKH</i> | tudor and KH domain containing | 1,7296 |
| 14 | 16966285 | <i>UCHL1</i> / | ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase) /// ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase) | -1,7271 |
| 15 | 16800962 | <i>SLC27A2</i> | solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2 | -2,2404 |
| 16 | 16697695 | <i>KIF14</i> | kinesin family member 14 | 1,7671 |
| 17 | 16815918 | <i>TNFRSF17</i> | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17 | -1,5686 |
| 18 | 16814183 | <i>ARHGDIG</i> | Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) gamma | 2,5266 |
| 19 | 16741501 | <i>DHCR7</i> | 7-dehydrocholesterol reductase | -1,8235 |
| 20 | 16911493 | <i>SPTLC3</i> | serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 3 | 1,8228 |
| 21 | 16927790 | <i>IGLC1</i> /// <i>IGLV3-25</i> | immunoglobulin lambda constant 1 (Mcg marker) | -1,6779 |
| 22 | 16698529 | <i>NUCKS1</i> | nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1 | 1,5015 |
| 23 | 16799492 | <i>LOC100505573</i> | uncharacterized LOC100505573 | 1,9582 |
| 24 | 16927787 | <i>IGLV3-27</i> | immunoglobulin lambda variable 3-27 | -2,1462 |
| 25 | 16891107 | <i>WNT10A</i> | wingless-type MMTV integration site family, member 10A | -1,4580 |
| 26 | 16799577 | <i>CHST14</i> | carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 14 | -1,8400 |
| 27 | 17093245 | <i>AQP3</i> | aquaporin 3 (Gill blood group) | -1,6772 |
| 28 | 16797378 | <i>IGHG1</i> | immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker) | -2,2145 |
| 29 | 16793885 | <i>RAB15</i> | RAB15, member RAS oncogene family | -1,8380 |

| | | | | |
|----|----------|---------------------------|--|---------|
| 30 | 16940593 | <i>P4HTM</i> | prolyl 4-hydroxylase, transmembrane (endoplasmic reticulum) | -1,4433 |
| 31 | 16708249 | <i>SCD</i> | stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase) | -1,9709 |
| 32 | 16844046 | <i>SNORA21 /// RPL23</i> | small nucleolar RNA, H/ACA box 21 /// ribosomal protein L23 | 1,8872 |
| 33 | 17059932 | <i>PON2</i> | paraoxonase 2 | 1,5843 |
| 34 | 16924147 | <i>TPTE</i> | transmembrane phosphatase with tensin homology | 2,0554 |
| 35 | 16698984 | <i>NEK2</i> | NIMA-related kinase 2 | 1,6285 |
| 36 | 16896442 | <i>EIF2AK2</i> | eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2 | 1,6539 |
| 37 | 16844312 | <i>TOP2A</i> | topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa | 1,5883 |
| 38 | 17046094 | <i>RNU1-14P</i> | RNA, U1 small nuclear 14, pseudogene | 2,5165 |
| 39 | 16943184 | <i>ST3GAL6</i> | ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6 | 1,7729 |
| 40 | 17005368 | <i>ALDH5A1</i> | aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1 | -1,7486 |
| 41 | 16949759 | <i>HES1</i> | hairy and enhancer of split 1, (Drosophila) | -2,1112 |
| 42 | 16727570 | <i>C11orf80</i> | chromosome 11 open reading frame 80 | -1,6450 |
| 43 | 16770789 | <i>C12orf49</i> | chromosome 12 open reading frame 49 | -1,5616 |
| 44 | 16833488 | <i>MRM1</i> | mitochondrial rRNA methyltransferase 1 homolog (S. cerevisiae) | -1,4732 |
| 45 | 16855898 | <i>CBLN2</i> | cerebellin 2 precursor | -2,0109 |
| 46 | 17042984 | <i>CHST12</i> | carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 12 | -1,5928 |
| 47 | 16986249 | <i>HMGCR</i> | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase | -1,4571 |
| 48 | 16972950 | <i>ANKRD37</i> | ankyrin repeat domain 37 | -1,4140 |
| 49 | 17017935 | <i>HLA-DOB /// TAP2</i> | major histocompatibility complex, class II, DO beta | -1,5440 |
| 50 | 16733989 | <i>MIR210</i> | microRNA 210 | -1,6391 |
| 51 | 17064135 | <i>PDIA4</i> | protein disulfide isomerase family A, member 4 | -1,3672 |
| 52 | 17104049 | <i>MAGED2 /// SNORA11</i> | melanoma antigen family D, 2 /// small nucleolar RNA, H/ACA box 11 | -2,2135 |
| 53 | 16811638 | <i>SEMA7A</i> | semaphorin 7A, GPI membrane anchor (John Milton Hagen blood group) | -1,5388 |
| 54 | 16835672 | <i>ITGA3</i> | integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor) | -1,6387 |
| 55 | 16830577 | <i>CD68 /// SNORA67</i> | CD68 molecule /// small nucleolar RNA, H/ACA box 67 | 1,9670 |
| 56 | 16677425 | <i>CENPF</i> | centromere protein F, 350/400kDa | 1,7347 |
| 57 | 16748620 | <i>ATF7IP</i> | activating transcription factor 7 interacting protein | 1,4339 |
| 58 | 16675673 | <i>CAMSAP2</i> | calmodulin regulated spectrin-associated protein family, member 2 | 1,6086 |
| 59 | 16659140 | <i>PLOD1</i> | procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 | -1,7806 |
| 60 | 16812517 | <i>LOC388152</i> | golgin A2 pseudogene | -1,3278 |
| 61 | 16837226 | <i>SNORA38B</i> | small nucleolar RNA, H/ACA box 38B | -1,9131 |
| 62 | 16711464 | <i>ANKRD16</i> | ankyrin repeat domain 16 | -1,3960 |
| 63 | 16740524 | <i>RNASEH2C</i> | ribonuclease H2, subunit C | -1,4251 |
| 64 | 16734092 | <i>CEND1</i> | cell cycle exit and neuronal differentiation 1 | -1,4207 |
| 65 | 16825779 | <i>SEPT1</i> | septin 1 | -1,5320 |
| 66 | 16662623 | <i>ZC3H12A</i> | zinc finger CCCH-type containing 12A | -1,4665 |
| 67 | 16844099 | <i>CACNB1</i> | calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit | -1,3520 |
| 68 | 16710906 | <i>ZNF511</i> | zinc finger protein 511 | -1,5987 |
| 69 | 16842850 | <i>DHRS13</i> | dehydrogenase/reductase (SDR family) member 13 | -1,6364 |
| 70 | 16695268 | <i>IGSF8</i> | immunoglobulin superfamily, member 8 | -1,4159 |

| | | | | |
|-----|----------|-----------------------------------|--|---------|
| 71 | 16799690 | <i>SPINT1</i> | serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1 | -1,6686 |
| 72 | 16826019 | <i>C16orf58</i> | chromosome 16 open reading frame 58 | -1,5785 |
| 73 | 17086496 | <i>DAPK1</i> | death-associated protein kinase 1 | -1,5807 |
| 74 | 16686010 | <i>LEPRE1</i> | leucine proline-enriched proteoglycan (leprecan) 1 | -1,4417 |
| 75 | 16661314 | <i>SFN</i> | stratifin | -1,4721 |
| 76 | 16906534 | <i>STAT1</i> | signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa | 1,7165 |
| 77 | 16803006 | <i>LOC729739</i> | peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) pseudogene | 2,0813 |
| 78 | 17102689 | <i>USP9X</i> | ubiquitin specific peptidase 9, X-linked | 1,3614 |
| 79 | 16911283 | <i>PLCB1</i> | phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific) | 1,4544 |
| 80 | 16798801 | <i>ARHGAP11B</i> | Rho GTPase activating protein 11B | 1,8806 |
| 81 | 17023484 | <i>ARHGAP18</i> | Rho GTPase activating protein 18 | 1,3925 |
| 82 | 17045555 | <i>BLVRA</i> | biliverdin reductase A | 1,8577 |
| 83 | 16958124 | <i>PARP9</i> | poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9 | 2,3008 |
| 84 | 16961806 | <i>GNB4</i> | guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4 | 1,9562 |
| 85 | 16692452 | <i>NBPF14</i> /// <i>NBPF8</i> | neuroblastoma breakpoint family, member 14 | 1,9937 |
| 86 | 16759469 | <i>SNORA49</i> | small nucleolar RNA, H/ACA box 49 | 1,9804 |
| 87 | 17012163 | <i>RNU1-18P</i> | RNA, U1 small nuclear 18, pseudogene | 2,2760 |
| 88 | 16923031 | <i>MX1</i> | myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse) | 1,9884 |
| 89 | 16811994 | <i>PEAK1</i> | NKF3 kinase family member | 1,6269 |
| 90 | 16765513 | <i>CBX5</i> | chromobox homolog 5 | 1,3674 |
| 91 | 17021122 | <i>IBTK</i> | inhibitor of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase | 1,4665 |
| 92 | 17050797 | <i>CPED1</i> | cadherin-like and PC-esterase domain containing 1 | 1,5166 |
| 93 | 16718800 | <i>RAB11FIP2</i> | RAB11 family interacting protein 2 (class I) | 1,3790 |
| 94 | 17076346 | <i>PPAPDC1B</i> | phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1B /// NULL | -1,3170 |
| 95 | 16803959 | <i>LOC388152</i> | golgin A2 pseudogene /// chondroitin sulfate proteoglycan 4 pseudogene 8 | -1,2939 |
| 96 | 16825810 | <i>LOC100506928</i> | uncharacterized LOC100506928 | -1,7497 |
| 97 | 16960647 | <i>DHX36</i> | DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36 | 1,4335 |
| 98 | 16985518 | <i>PIK3R1</i> | phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha) | 1,4323 |
| 99 | 16858386 | <i>LDLR</i> | low density lipoprotein receptor | -1,6679 |
| 100 | 16745236 | <i>H2AFX</i> | H2A histone family, member X | -1,4897 |

Supplementary Table 3. List of the differentially deregulated genes after PDF treatment *in vitro* involved in mitotic and cell cycle processes. Genes are ordered by the number of “GO Biological processes” in which the genes are involved. Shaded genes are potential candidates mediating PDF effects *in vitro*.

| Position by number of mitotic functions | Affimetrix probe set | Gene symbol | Gene Title | Fold Change |
|---|----------------------|----------------------------|--|-------------|
| 1 | 16985599 | <i>CCNB1</i> | cyclin B1 | 1,4632 |
| 2 | 16730845 | <i>ATM</i> /// <i>NPAT</i> | ataxia telangiectasia mutated /// nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus | 1,2661 |
| 3 | 17000439 | <i>CDC25C</i> | cell division cycle 25C | 1,4680 |
| 4 | 16916958 | <i>PCNA</i> | proliferating cell nuclear antigen | -1,6766 |
| 5 | 16931384 | <i>GTSE1</i> | G-2 and S-phase expressed 1 | 1,3133 |
| 6 | 16777502 | <i>CENPJ</i> | centromere protein J | -1,2262 |
| 7 | 16840732 | <i>TP53</i> | tumor protein p53 | -1,1606 |
| 8 | 16753853 | <i>MDM2</i> | MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase | -1,1677 |
| 9 | 16918445 | <i>E2F1</i> | E2F transcription factor 1 | -2,0685 |
| 10 | 16864244 | <i>PRMT1</i> | protein arginine methyltransferase 1 | -1,6228 |
| 11 | 16890915 | <i>RQCD1</i> | RCD1 required for cell differentiation1 homolog (S. pombe) | -1,3821 |
| 12 | 17052776 | <i>CASP2</i> | caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase | -1,4116 |
| 13 | 16802918 | <i>PML</i> | promyelocytic leukemia | 1,3334 |
| 14 | 16676150 | <i>BTG2</i> | BTG family, member 2 | 1,2570 |
| 15 | 16856315 | <i>ARID3A</i> | AT rich interactive domain 3A (BRIGHT-like) | -1,2818 |
| 16 | 16818980 | <i>RBL2</i> | retinoblastoma-like 2 (p130) | 1,2404 |
| 17 | 16858321 | <i>CARM1</i> | coactivator-associated arginine methyltransferase 1 | -1,2243 |
| 18 | 16776905 | <i>TFDP1</i> | transcription factor Dp-1 | -1,2753 |
| 19 | 16977196 | <i>CNOT6L</i> | CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like | -1,1786 |
| 20 | 16665932 | <i>GADD45A</i> | growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha | -1,1798 |
| 21 | 16728261 | <i>CCND1</i> | cyclin D1 | -1,6265 |
| 22 | 16658192 | <i>TP73</i> | tumor protein p73 | -1,7339 |
| 23 | 17076867 | <i>PRKDC</i> | protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide | -1,3638 |
| 24 | 16684089 | <i>RPA2</i> | replication protein A2, 32kDa | -1,2865 |
| 25 | 17104578 | <i>FOXO4</i> | forkhead box O4 | 1,1740 |
| 26 | 16968697 | <i>PKD2</i> | polycystic kidney disease 2 (autosomal dominant) | -1,2382 |
| 27 | 16850517 | <i>NDC80</i> | NDC80 kinetochore complex component | 1,3460 |
| 28 | 16834056 | <i>CDC6</i> | cell division cycle 6 | -1,9952 |
| 29 | 16877473 | <i>GEN1</i> | GEN1 Holliday junction 5' flap endonuclease | 1,2656 |
| 30 | 16766683 | <i>CDK4</i> | cyclin-dependent kinase 4 | -1,4386 |
| 31 | 16872551 | <i>TGFB1</i> | transforming growth factor, beta 1 | 1,5768 |
| 32 | 16677425 | <i>CENPF</i> | centromere protein F, 350/400kDa | 1,6572 |

| | | | | |
|----|----------|---------------------------------|---|---------|
| 33 | 16799426 | <i>BUB1B</i> /// <i>PAK6</i> | BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B /// p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6 | 1,1930 |
| 34 | 16855697 | <i>VPS4B</i> | vacuolar protein sorting 4 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) | 1,2360 |
| 35 | 16927052 | <i>CDC45</i> | cell division cycle 45 | -1,4873 |
| 36 | 16697695 | <i>KIF14</i> | kinesin family member 14 | 1,3877 |
| 37 | 16802152 | <i>RAB11A</i> | RAB11A, member RAS oncogene family | 1,3172 |
| 38 | 16683644 | <i>SYF2</i> | SYF2 homolog, RNA splicing factor (<i>S. cerevisiae</i>) | 1,2579 |
| 39 | 16804902 | <i>BLM</i> | Bloom syndrome, RecQ helicase-like | -1,2068 |
| 40 | 16959325 | <i>TOPBP1</i> | topoisomerase (DNA) II binding protein 1 | -1,1830 |
| 41 | 16924068 | <i>PRMT2</i> | protein arginine methyltransferase 2 | 1,5107 |
| 42 | 16939023 | <i>CTDSPL</i> | CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like | 1,5173 |
| 43 | 16766767 | <i>CTDSP2</i> | CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 2 | 1,3865 |
| 44 | 17010552 | <i>TTK</i> | TTK protein kinase | 1,3546 |
| 45 | 16685165 | <i>CLSPN</i> | claspin | -1,4069 |
| 46 | 16827170 | <i>NAE1</i> | NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1 | -1,2329 |
| 47 | 16868847 | <i>KANK2</i> | KN motif and ankyrin repeat domains 2 | -1,2421 |
| 48 | 16667037 | <i>CDC7</i> | cell division cycle 7 | -1,2438 |
| 49 | 16901755 | <i>BUB1</i> | BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase | 1,2082 |
| 50 | 16817182 | <i>LCMT1</i> | leucine carboxyl methyltransferase 1 | 1,1895 |
| 51 | 16682425 | <i>RCC2</i> | regulator of chromosome condensation 2 | -1,4513 |
| 52 | 17113744 | <i>CUL4B</i> | cullin 4B | 1,3571 |
| 53 | 16781516 | <i>APEX1</i> | APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1 /// APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1 | -1,3733 |
| 54 | 16746992 | <i>CCND2</i> | cyclin D2 | -1,3807 |
| 55 | 16948909 | <i>EIF4G1</i> | eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1 | -1,2739 |
| 56 | 16834812 | <i>DBF4B</i> | DBF4 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) | 1,2511 |
| 57 | 16760649 | <i>PHB2</i> | prohibitin 2 | -1,1737 |
| 58 | 16673191 | <i>PBX1</i> | pre-B-cell leukemia homeobox 1 /// uncharacterized LOC100131938 | 2,6468 |
| 59 | 16834486 | <i>PSME3</i> | proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki) /// proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki) | -1,4365 |
| 60 | 16793225 | <i>DLGAP5</i> | discs, large (<i>Drosophila</i>) homolog-associated protein 5 | 1,4023 |
| 61 | 17053019 | <i>CUL1</i> | cullin 1 | -1,3893 |
| 62 | 16733104 | <i>CHEK1</i> | checkpoint kinase 1 | -1,1916 |
| 63 | 16897026 | <i>ZFP36L2</i> | ZFP36 ring finger protein-like 2 | 3,0419 |
| 64 | 16810933 | <i>TIPIN</i> | TIMELESS interacting protein | -2,1573 |
| 65 | 16698984 | <i>NEK2</i> | NIMA-related kinase 2 | 1,6175 |
| 66 | 16663514 | <i>CDC20</i> | cell division cycle 20 | 1,5784 |
| 67 | 16927198 | <i>RANBP1</i> | RAN binding protein 1 /// RAN binding protein 1 | -1,4861 |
| 68 | 16912871 | <i>CHMP4B</i> | charged multivesicular body protein 4B | -1,2450 |
| 69 | 16843131 | <i>CRLF3</i> | cytokine receptor-like factor 3 | -1,2154 |
| 70 | 17088929 | <i>NEK6</i> | NIMA-related kinase 6 | -1,2410 |
| 71 | 16869570 | <i>PRKACA</i> | protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha | 1,2121 |
| 72 | 16949214 | <i>SEN2</i> | SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 2 | -1,1819 |
| 73 | 17070331 | <i>CHMP4C</i> | charged multivesicular body protein 4C | 2,3538 |

| | | | | |
|-----|----------|------------------------------|---|---------|
| 74 | 16879883 | <i>MSH2</i> | mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli) | -1,7236 |
| 75 | 16911040 | <i>CDC25B</i> | cell division cycle 25B | 1,4458 |
| 76 | 16856959 | <i>FZR1</i> | fizzy/cell division cycle 20 related 1 (Drosophila) | 1,3170 |
| 77 | 16978568 | <i>CENPE</i> | centromere protein E, 312kDa | 1,4784 |
| 78 | 16932008 | <i>BID</i> | BH3 interacting domain death agonist | -1,3007 |
| 79 | 16707221 | <i>KIF20B</i> | kinesin family member 20B | 1,2419 |
| 80 | 16846568 | <i>PPP1R9B</i> | protein phosphatase 1, regulatory subunit 9B /// protein phosphatase 1, regulatory subunit 9B | 1,3048 |
| 81 | 16872089 | <i>SIRT2</i> | sirtuin 2 | 1,2545 |
| 82 | 16734475 | <i>CDKN1C</i> | cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2) | -1,2842 |
| 83 | 16840902 | <i>AURKB</i> | aurora kinase B | 1,1459 |
| 84 | 16912379 | <i>TPX2</i> | TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis) | 1,3027 |
| 85 | 16708468 | <i>BTRC</i> | beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase | 1,3250 |
| 86 | 17045198 | <i>ANLN</i> | anillin, actin binding protein | 1,2004 |
| 87 | 16799793 | <i>NUSAP1</i> | nucleolar and spindle associated protein 1 | 1,1957 |
| 88 | 16845263 | <i>BECN1</i> | beclin 1, autophagy related /// beclin 1, autophagy related | 1,2025 |
| 89 | 16661589 | <i>RCC1</i> /// <i>SNHG3</i> | regulator of chromosome condensation 1 /// small nucleolar RNA host gene 3 (non-protein coding) /// regulator of chromosome condensation 1 /// small nucleolar RNA, H/ACA box 73A | -1,1816 |
| 90 | 16821869 | <i>CDT1</i> | chromatin licensing and DNA replication factor 1 | -1,1822 |
| 91 | 16705942 | <i>ANAPC16</i> | anaphase promoting complex subunit 16 | 1,5602 |
| 92 | 16851022 | <i>CHMP1B</i> | charged multivesicular body protein 1B | 1,3508 |
| 93 | 16964000 | <i>TACC3</i> | transforming, acidic coiled-coil containing protein 3 | 1,3577 |
| 94 | 16770040 | <i>ANAPC7</i> | anaphase promoting complex subunit 7 | -1,1713 |
| 95 | 16760048 | <i>FOXM1</i> | forkhead box M1 | 1,1660 |
| 96 | 16802519 | <i>KIF23</i> | kinesin family member 23 | 1,1471 |
| 97 | 16836214 | <i>TOM1L1</i> | target of myb1 (chicken)-like 1 | 2,5848 |
| 98 | 16769250 | <i>IGF1</i> | insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) | 1,8607 |
| 99 | 16867915 | <i>INSR</i> | insulin receptor | 1,8113 |
| 100 | 16953279 | <i>CDC25A</i> | cell division cycle 25A | -1,6930 |
| 101 | 16844312 | <i>TOP2A</i> | topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa | 1,4734 |
| 102 | 17117724 | <i>PSMD3</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3 /// uncharacterized LOC100505620 | 1,6826 |
| 103 | 16898788 | <i>TGFA</i> | transforming growth factor, alpha | 1,5199 |
| 104 | 16821021 | <i>PSMD7</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7 | -1,4781 |
| 105 | 16892039 | <i>PSMD1</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 1 | -1,3538 |
| 106 | 16935228 | <i>PDGFB</i> | platelet-derived growth factor beta polypeptide | 1,3652 |
| 107 | 16848032 | <i>PSMD12</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12 | -1,3750 |
| 108 | 16833139 | <i>PSMD11</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11 | -1,4914 |
| 109 | 16814825 | <i>EME2</i> / | essential meiotic endonuclease 1 homolog 2 (S. pombe) | -1,3249 |
| 110 | 16714504 | <i>ZWINT</i> | ZW10 interacting kinetochore protein | -1,2939 |
| 111 | 16841982 | <i>TOM1L2</i> | target of myb1-like 2 (chicken) | 1,2654 |
| 112 | 16709140 | <i>SMC3</i> | structural maintenance of chromosomes 3 | -1,2786 |

| | | | | |
|-----|----------|-----------------------------|---|---------|
| 113 | 16690594 | <i>PSMA5</i> | proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5 | -1,2968 |
| 114 | 16905322 | <i>ATF2</i> | activating transcription factor 2 | 1,2576 |
| 115 | 16835797 | <i>EME1</i> | essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (S. pombe) | 1,2923 |
| 116 | 16886919 | <i>PSMD14</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14 /// proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14 | -1,2337 |
| 117 | 16889807 | <i>CD28</i> | CD28 molecule | -1,2173 |
| 118 | 16948871 | <i>PSMD2</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2 | -1,2342 |
| 119 | 17007307 | <i>PSMB9</i> | proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 | 1,2180 |
| 120 | 17049965 | <i>PSMC2</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 2 | -1,2353 |
| 121 | 17090373 | <i>ABL1</i> | c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase | 1,2422 |
| 122 | 16862145 | <i>PSMC4</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4 | -1,1954 |
| 123 | 16738023 | <i>PSMC3</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3 | -1,2191 |
| 124 | 16784642 | <i>PSMA3</i> | proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3 | -1,2128 |
| 125 | 17067963 | <i>EIF4EBP1</i> | eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 | -1,2605 |
| 126 | 16670850 | <i>PSMB4</i> | proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 4 | -1,1502 |
| 127 | 16829885 | <i>PSMB6</i> | proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 6 | -1,1718 |
| 128 | 16803540 | <i>PSMA4</i> | proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 4 | -1,1959 |
| 129 | 16727802 | <i>RAD9A</i> | RAD9 homolog A (S. pombe) /// uncharacterized LOC100130987 | -1,1552 |
| 130 | 17079293 | <i>CCNE2</i> | cyclin E2 | -1,7937 |
| 131 | 17101622 | <i>OFD1</i> | oral-facial-digital syndrome 1 | 1,5815 |
| 132 | 16984032 | <i>SKP2</i> | S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase | -1,3950 |
| 133 | 16784299 | <i>CDKN3</i> | cyclin-dependent kinase inhibitor 3 | 1,4047 |
| 134 | 17115077 | <i>CETN2</i> | centrin, EF-hand protein, 2 | 1,2935 |
| 135 | 16832852 | <i>ATAD5</i> | ATPase family, AAA domain containing 5 | -1,2622 |
| 136 | 16733952 | <i>HRAS</i> /// <i>HRAS</i> | v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog | -1,2267 |
| 137 | 16801557 | <i>CCNB2</i> | cyclin B2 | 1,9254 |
| 138 | 16860418 | <i>CCNE1</i> | cyclin E1 | -1,7116 |
| 139 | 16840018 | <i>MYBBP1A</i> | MYB binding protein (P160) 1a | -1,6200 |
| 140 | 16736638 | <i>E2F8</i> | E2F transcription factor 8 | -1,3603 |
| 141 | 17102230 | <i>POLA1</i> | polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit | -1,3197 |
| 142 | 17019287 | <i>CUL7</i> | cullin 7 | 1,3046 |
| 143 | 16766590 | <i>DCTN2</i> | dynactin 2 (p50) | 1,2546 |
| 144 | 16744684 | <i>ZNF259</i> | zinc finger protein 259 | -1,1865 |
| 145 | 16992096 | <i>SPDL1</i> | spindle apparatus coiled-coil protein 1 | 1,2281 |
| 146 | 16877007 | <i>KLF11</i> | Kruppel-like factor 11 | -1,9137 |
| 147 | 16823512 | <i>TFAP4</i> | transcription factor AP-4 (activating enhancer binding protein 4) | -1,4977 |
| 148 | 16687188 | <i>ORC1</i> | origin recognition complex, subunit 1 | -1,5622 |
| 149 | 17104484 | <i>KIF4A</i> | kinesin family member 4A | 1,5053 |
| 150 | 16908373 | <i>USP37</i> | ubiquitin specific peptidase 37 | -1,4526 |

| | | | | |
|-----|----------|----------------------|---|---------|
| 151 | 16766318 | PRIM1 | primase, DNA, polypeptide 1 (49kDa) | -1,5116 |
| 152 | 16661117 | CEP85 | centrosomal protein 85kDa | -1,3700 |
| 153 | 16815090 | CCNF | cyclin F | 1,2950 |
| 154 | 16726790 | POLA2 | polymerase (DNA directed), alpha 2, accessory subunit | -1,3007 |
| 155 | 16983412 | FBXL7 | F-box and leucine-rich repeat protein 7 | 1,4379 |
| 156 | 17093480 | DCTN3 | dynactin 3 (p22) | 1,3297 |
| 157 | 17038792 | KIFC1 | kinesin family member C1 | 1,3246 |
| 158 | 17007459 | KIFC1 | kinesin family member C1 /// kinesin family member C1 | 1,3267 |
| 159 | 17041352 | KIFC1 /// RPL12P1 | kinesin family member C1 | 1,3267 |
| 160 | 16666896 | PKN2 | protein kinase N2 | 1,3515 |
| 161 | 17092688 | HAUS6 | HAUS augmin-like complex, subunit 6 | -1,4165 |
| 162 | 16835272 | KPNB1 | karyopherin (importin) beta 1 | -1,3019 |
| 163 | 16852206 | HAUS1 | HAUS augmin-like complex, subunit 1 | 1,3068 |
| 164 | 16858774 | CALR | calreticulin | -1,1904 |
| 165 | 16850477 | TYMS | thymidylate synthetase | -1,2265 |
| 166 | 16744078 | NPAT | nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus | -1,2213 |
| 167 | 16809506 | ARPP19 | cAMP-regulated phosphoprotein, 19kDa | -1,1773 |
| 168 | 17086634 | CKS2 | CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 | 1,2489 |
| 169 | 16772625 | POLE | polymerase (DNA directed), epsilon, catalytic subunit | -1,2252 |
| 170 | 17008867 | CUL9 | cullin 9 | 1,2387 |
| 171 | 16800108 | HAUS2 | HAUS augmin-like complex, subunit 2 | -1,1776 |
| 172 | 16829764 | GSG2 | germ cell associated 2 (haspin) | 1,1824 |
| 173 | 16912625 | MAPRE1 | microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1 | -1,1615 |
| 174 | 16676183 | ATP2B4 | ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 4 | 4,5334 |
| 175 | 16694617 | IQGAP3 | IQ motif containing GTPase activating protein 3 | 3,2017 |
| 176 | 16903090 | MCM6 | minichromosome maintenance complex component 6 | -2,0534 |
| 177 | 16959668 | CEP70 | centrosomal protein 70kDa | 1,9416 |
| 178 | 17020019 | MCM3 | minichromosome maintenance complex component 3 | -1,5997 |
| 179 | 16702547 | OPTN | optineurin | 1,5317 |
| 180 | 16702571 | MCM10 | minichromosome maintenance complex component 10 | -1,6061 |
| 181 | 17068782 | MCM4 | minichromosome maintenance complex component 4 | -1,6929 |
| 182 | 16945101 | MCM2 | minichromosome maintenance complex component 2 | -1,6040 |
| 183 | 16976158 | PPAT | phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase | -1,6920 |
| 184 | 16707551 | CEP55 | centrosomal protein 55kDa | 1,4996 |
| 185 | 16818600 | ORC6 | origin recognition complex, subunit 6 | -1,4150 |
| 186 | 17060412 | MCM7 | minichromosome maintenance complex component 7 | -1,5393 |
| 187 | 16929573 | MCM5 | minichromosome maintenance complex component 5 | -1,5156 |
| 188 | 16799598 | CASC5 | cancer susceptibility candidate 5 | 1,5386 |
| 189 | 16897797 | PNPT1 | polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1 | -1,5687 |
| 190 | 17058905 | YWHAQ | tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide | -1,3809 |
| 191 | 16911212 | MCM8 | minichromosome maintenance complex component 8 | -1,4598 |
| 192 | 16991859 | HMMR | hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM) | 1,4882 |
| 193 | 16730540 | BIRC2 | baculoviral IAP repeat containing 2 | 1,4471 |

| | | | | |
|-----|----------|------------------------------------|--|---------|
| 194 | 16850189 | <i>CSNK1D</i> | casein kinase 1, delta /// casein kinase 1, delta | 1,2736 |
| 195 | 16994170 | <i>NSUN2</i> | NOP2/Sun RNA methyltransferase family, member 2 | -1,3563 |
| 196 | 16887601 | <i>DYNC1I2</i> | dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2 /// dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2 pseudogene 1 | 1,3217 |
| 197 | 16869841 | <i>AKAP8</i> | A kinase (PRKA) anchor protein 8 | -1,3131 |
| 198 | 16913957 | <i>MYBL2</i> | v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2 | -1,2653 |
| 199 | 16903427 | <i>ORC4</i> | origin recognition complex, subunit 4 | 1,2915 |
| 200 | 17108546 | <i>BRCC3</i> | BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3 | -1,2005 |
| 201 | 17089667 | <i>ODF2</i> | outer dense fiber of sperm tails 2 | 1,2027 |
| 202 | 17066118 | <i>PCM1</i> | pericentriolar material 1 | 1,2752 |
| 203 | 17050154 | <i>PRKAR2B</i> | protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta | -1,2736 |
| 204 | 16978387 | <i>PPP3CA</i> | protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme | -1,2282 |
| 205 | 16824004 | <i>GSPT1</i> | G1 to S phase transition 1 | -1,1956 |
| 206 | 17088589 | <i>CNTRL</i> | centriolin | -1,3191 |
| 207 | 16869860 | <i>AKAP8L</i> | A kinase (PRKA) anchor protein 8-like | 1,1707 |
| 208 | 16762573 | <i>ASUN</i> | asunder spermatogenesis regulator | -1,2162 |
| 209 | 17065292 | <i>MCPH1</i> | microcephalin 1 | 1,1874 |
| 210 | 16757255 | <i>PTPN11</i> | protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 | -1,1684 |
| 211 | 16859454 | <i>BABAM1</i> | BRISC and BRCA1 A complex member 1 /// BRISC and BRCA1 A complex member 1 | 1,1937 |
| 212 | 17074571 | <i>PINX1</i> /// <i>SOX7</i> | PIN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1 /// PIN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1 /// SRY (sex determining region Y)-box 7 /// | -1,7907 |
| 213 | 17069545 | <i>RRS1</i> | RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (S. cerevisiae) | -1,8081 |
| 214 | 16851121 | <i>SEH1L</i> | SEH1-like (S. cerevisiae) | -1,6177 |
| 215 | 16736891 | <i>KIF18A</i> | kinesin family member 18A | 1,4470 |
| 216 | 16813342 | <i>PRC1</i> | protein regulator of cytokinesis 1 | 1,4497 |
| 217 | 16658664 | <i>SLC25A33</i> | solute carrier family 25 (pyrimidine nucleotide carrier), member 33 | -1,5337 |
| 218 | 16662648 | <i>CDCA8</i> | cell division cycle associated 8 | 1,3750 |
| 219 | 16877956 | <i>CENPA</i> /// <i>SLC35F6</i> | centromere protein A /// solute carrier family 35, member F6 | 1,2900 |
| 220 | 16800209 | <i>TUBGCP4</i> | tubulin, gamma complex associated protein 4 | -1,3765 |
| 221 | 16681210 | <i>KLHL21</i> | kelch-like family member 21 | -1,3355 |
| 222 | 16702503 | <i>CDC123</i> | cell division cycle 123 | -1,2633 |
| 223 | 16663958 | <i>KIF2C</i> | kinesin family member 2C | 1,3087 |
| 224 | 16725735 | <i>FEN1</i> | flap structure-specific endonuclease 1 | -1,3229 |
| 225 | 16838359 | <i>BIRC5</i> | baculoviral IAP repeat containing 5 | 1,2458 |
| 226 | 17110058 | <i>DYNLT3</i> | dynein, light chain, Tctex-type 3 | 1,3286 |
| 227 | 16779720 | <i>MZT1</i> | mitotic spindle organizing protein 1 | -1,2812 |
| 228 | 16995140 | <i>RAD1</i> | RAD1 homolog (S. pombe) | -1,2788 |
| 229 | 17098808 | <i>GOLGA2</i> | golgin A2 | 1,2481 |
| 230 | 16902411 | <i>BIN1</i> | bridging integrator 1 | 1,1726 |
| 231 | 16781136 | <i>TUBGCP3</i> | tubulin, gamma complex associated protein 3 | -1,1926 |
| 232 | 16686796 | <i>STIL</i> | SCL/TAL1 interrupting locus | 1,1698 |
| 233 | 16730522 | <i>BIRC3</i> | baculoviral IAP repeat containing 3 | 1,2017 |

| | | | | |
|-----|----------|-----------------|---|---------|
| 234 | 16869643 | <i>GIPC1</i> | GIPC PDZ domain containing family, member 1 | 2,1892 |
| 235 | 16949759 | <i>HES1</i> | hairy and enhancer of split 1, (<i>Drosophila</i>) | -2,3674 |
| 236 | 16945664 | <i>NUDT16</i> | nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 16 | 2,2200 |
| 237 | 16843376 | <i>NLE1</i> | notchless homolog 1 (<i>Drosophila</i>) | -1,4643 |
| 238 | 16957568 | <i>NAA50</i> | N(alpha)-acetyltransferase 50, NatE catalytic subunit | -1,3816 |
| 239 | 16697544 | <i>ASPM</i> | asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (<i>Drosophila</i>) | 1,5645 |
| 240 | 16658449 | <i>PHF13</i> | PHD finger protein 13 | -1,3156 |
| 241 | 16845794 | <i>KIF18B</i> | kinesin family member 18B | 1,2869 |
| 242 | 16746379 | <i>NCAPD3</i> | non-SMC condensin II complex, subunit D3 | -1,3057 |
| 243 | 17067410 | <i>FZD3</i> | frizzled family receptor 3 | -1,3675 |
| 244 | 16991839 | <i>CCNG1</i> | cyclin G1 | 1,3014 |
| 245 | 16886757 | <i>PKP4</i> | plakophilin 4 | 1,2731 |
| 246 | 16924305 | <i>BTG3</i> | BTG family, member 3 | -1,2838 |
| 247 | 16747287 | <i>NCAPD2</i> | non-SMC condensin I complex, subunit D2 | 1,2419 |
| 248 | 16984083 | <i>NIPBL</i> | Nipped-B homolog (<i>Drosophila</i>) | 1,2540 |
| 249 | 17013072 | <i>HECA</i> | headcase homolog (<i>Drosophila</i>) | 1,2521 |
| 250 | 16766137 | <i>TIMELESS</i> | timeless circadian clock | -1,1973 |
| 251 | 17080595 | <i>DSCC1</i> | DNA replication and sister chromatid cohesion 1 | -1,2818 |
| 252 | 16799357 | <i>EIF2AK4</i> | eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4 | 2,3497 |
| 253 | 16828886 | <i>GINS2</i> | GINS complex subunit 2 (Psf2 homolog) | -1,9489 |
| 254 | 16802190 | <i>MAP2K1</i> | mitogen-activated protein kinase kinase 1 | 1,7290 |
| 255 | 17072669 | <i>MYC</i> | v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) | -1,7808 |
| 256 | 16668079 | <i>GPSM2</i> | G-protein signaling modulator 2 | 1,7670 |
| 257 | 16708552 | <i>NOLC1</i> | nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 | -1,7005 |
| 258 | 16687618 | <i>DHCR24</i> | 24-dehydrocholesterol reductase | -1,5488 |
| 259 | 16721479 | <i>ILK</i> | integrin-linked kinase | 1,6867 |
| 260 | 16707695 | <i>HELLS</i> | helicase, lymphoid-specific | -1,9358 |
| 261 | 16850063 | <i>STRA13</i> | stimulated by retinoic acid 13 | -1,4507 |
| 262 | 16781285 | <i>GAS6</i> | growth arrest-specific 6 | 1,5051 |
| 263 | 16936408 | <i>MAPK12</i> | mitogen-activated protein kinase 12 | -1,4710 |
| 264 | 16958812 | <i>RUVBL1</i> | RuvB-like 1 (<i>E. coli</i>) | -1,3470 |
| 265 | 16818755 | <i>PAPD5</i> | PAP associated domain containing 5 | -1,5775 |
| 266 | 16950569 | <i>TADA3</i> | transcriptional adaptor 3 | 1,3184 |
| 267 | 17067102 | <i>CDCA2</i> | cell division cycle associated 2 | 1,3876 |
| 268 | 16987008 | <i>RASA1</i> | RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1 | 1,3267 |
| 269 | 16950146 | <i>LMLN</i> | leishmanolysin-like (metallopeptidase M8 family) | 1,4166 |
| 270 | 16880122 | <i>SPTBN1</i> | spectrin, beta, non-erythrocytic 1 | 1,4163 |
| 271 | 16685596 | <i>RRAGC</i> | Ras-related GTP binding C | 1,3558 |
| 272 | 16718983 | <i>MCMBP</i> | minichromosome maintenance complex binding protein | -1,3547 |
| 273 | 16895848 | <i>PPM1G</i> | protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1G | -1,3294 |
| 274 | 16856153 | <i>TXNL4A</i> | thioredoxin-like 4A /// thioredoxin-like 4A | -1,4108 |
| 275 | 16856463 | <i>STK11</i> | serine/threonine kinase 11 | 1,2680 |
| 276 | 16814927 | <i>TSC2</i> | tuberous sclerosis 2 /// tuberous sclerosis 2 | 1,3353 |

| | | | | |
|-----|----------|---------------------------------|---|---------|
| 277 | 16989636 | <i>KIF20A</i> | kinesin family member 20A | 1,3497 |
| 278 | 16775014 | <i>CKAP2</i> | cytoskeleton associated protein 2 | 1,2746 |
| 279 | 16671889 | <i>LAMTOR2</i> | late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 2 | 1,2901 |
| 280 | 16959465 | <i>ANAPC13</i> | anaphase promoting complex subunit 13 | -1,2918 |
| 281 | 16947904 | <i>SKIL</i> | SKI-like oncogene | 1,3348 |
| 282 | 16863243 | <i>MARK4</i> | MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4 | 1,2753 |
| 283 | 17070381 | <i>LRRCC1</i> | leucine rich repeat and coiled-coil centrosomal protein 1 | 1,3623 |
| 284 | 16847771 | <i>ERN1</i> | endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 | 1,2941 |
| 285 | 16953241 | <i>MAP4</i> | microtubule-associated protein 4 | 1,2887 |
| 286 | 16840262 | <i>NUP88</i> | nucleoporin 88kDa | -1,2444 |
| 287 | 16868838 | <i>SPC24</i> | SPC24, NDC80 kinetochore complex component | 1,2866 |
| 288 | 16760621 | <i>CDCA3</i> | cell division cycle associated 3 /// cell division cycle associated 3 | 1,2463 |
| 289 | 16673154 | <i>NUF2</i> | NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>) | 1,2743 |
| 290 | 16800991 | <i>USP8</i> | ubiquitin specific peptidase 8 | 1,2105 |
| 291 | 16697985 | <i>ARL8A</i> | ADP-ribosylation factor-like 8A | -1,2657 |
| 292 | 17099361 | <i>TSC1</i> | tuberous sclerosis 1 | 1,2335 |
| 293 | 17092852 | <i>KLHL9</i> | kelch-like family member 9 | 1,2663 |
| 294 | 16938271 | <i>KAT2B</i> | K(lysine) acetyltransferase 2B | 1,2097 |
| 295 | 16807605 | <i>OIP5</i> | Opa interacting protein 5 | 1,2784 |
| 296 | 17021596 | <i>RRAGD</i> | Ras-related GTP binding D | -1,2248 |
| 297 | 16760546 | <i>ING4</i> | inhibitor of growth family, member 4 | 1,3025 |
| 298 | 16951485 | <i>SGOL1</i> | shugoshin-like 1 (<i>S. pombe</i>) | 1,2402 |
| 299 | 16726925 | <i>SSSCA1</i> | Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1 | -1,2542 |
| 300 | 16847432 | <i>BRIP1</i> | BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1 | -1,2150 |
| 301 | 16692297 | <i>PRKAB2</i> | protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit /// 5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-2-like | 1,2324 |
| 302 | 16830839 | <i>CNTROB</i> | centrobin, centrosomal BRCA2 interacting protein | 1,1995 |
| 303 | 17057433 | <i>TBRG4</i> /// <i>SNORA5B</i> | transforming growth factor beta regulator 4 /// small nucleolar RNA, H/ACA box 5B | -1,2898 |
| 304 | 16939960 | <i>KIF15</i> | kinesin family member 15 | 1,2007 |
| 305 | 16659171 | <i>MFN2</i> | mitofusin 2 | -1,2024 |
| 306 | 16879408 | <i>EML4</i> | echinoderm microtubule associated protein like 4 | 1,2201 |
| 307 | 16673043 | <i>UHMK1</i> | U2AF homology motif (UHM) kinase 1 | -1,1728 |
| 308 | 16935142 | <i>SUN2</i> | Sad1 and UNC84 domain containing 2 | 1,2095 |
| 309 | 16911132 | <i>PRNP</i> | prion protein | -1,1875 |
| 310 | 16912192 | <i>GINS1</i> | GINS complex subunit 1 (Psf1 homolog) | -1,1576 |
| 311 | 16691668 | <i>NOTCH2</i> | notch 2 | 1,2558 |
| 312 | 16794898 | <i>NEK9</i> | NIMA-related kinase 9 | 1,2026 |
| 313 | 16661323 | <i>NUDC</i> | nuclear distribution C homolog (<i>A. nidulans</i>) | -1,1763 |
| 314 | 16851900 | <i>MAPRE2</i> | microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2 | -1,1507 |
| 315 | 16800355 | <i>WDR76</i> | WD repeat domain 76 | -1,4609 |
| 316 | 16677201 | <i>DTL</i> | denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog (<i>Drosophila</i>) | -1,5166 |
| 317 | 16773348 | <i>NUPL1</i> | nucleoporin like 1 | -1,3900 |
| 318 | 17084796 | <i>TMEM8B</i> | transmembrane protein 8B | 1,4079 |

| | | | | |
|-----|----------|---------------|---|---------|
| 319 | 16878556 | WDR43 | WD repeat domain 43 | -1,3830 |
| 320 | 16666835 | SH3GLB1 | SH3-domain GRB2-like endophilin B1 | 1,3543 |
| 321 | 17101815 | TXLNG | taxilin gamma | -1,3422 |
| 322 | 16995409 | NUP155 | nucleoporin 155kDa | -1,3460 |
| 323 | 17089898 | NUP188 | nucleoporin 188kDa | -1,3945 |
| 324 | 17015889 | NUP153 | nucleoporin 153kDa | -1,2870 |
| 325 | 17096091 | PTCH1 | patched 1 | 1,3830 |
| 326 | 17078134 | EYA1 | eyes absent homolog 1 (Drosophila) | 1,2446 |
| 327 | 16856699 | DOT1L | DOT1-like histone H3K79 methyltransferase | -1,3382 |
| 328 | 16833518 | AATF | apoptosis antagonizing transcription factor | -1,3220 |
| 329 | 16950932 | NUP210 | nucleoporin 210kDa | -1,2437 |
| 330 | 16931590 | PIM3 | pim-3 oncogene | -1,1965 |
| 331 | 17064679 | XRCC2 | X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2 | -1,2808 |
| 332 | 16802408 | FEM1B | fem-1 homolog b (C. elegans) | 1,1824 |
| 333 | 16738869 | PRPF19 | pre-mRNA processing factor 19 | -1,1841 |
| 334 | 16852098 | PIK3C3 | phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit type 3 | 1,2416 |
| 335 | 16765284 | AAAS | achalasia, adrenocortical insufficiency, alacrimia | -1,1772 |
| 336 | 16702351 | GATA3 | GATA binding protein 3 | 1,8809 |
| 337 | 16666616 | PRKACB | protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta | -1,6132 |
| 338 | 16909551 | NPPC | natriuretic peptide C | -1,7371 |
| 339 | 16973578 | SLBP | stem-loop binding protein | -1,3883 |
| 340 | 17008036 | C6orf89 | chromosome 6 open reading frame 89 | 1,3555 |
| 341 | 17023414 | PTPRK | protein tyrosine phosphatase, receptor type, K | 1,5075 |
| 342 | 16873313 | ERCC1 | excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence) | 1,3571 |
| 343 | 16881786 | HTRA2 | HtrA serine peptidase 2 | -1,2968 |
| 344 | 16683624 | RUNX3 | runt-related transcription factor 3 | -1,4499 |
| 345 | 17005396 | GMNN | geminin, DNA replication inhibitor | -1,3148 |
| 346 | 16734762 | TRIM21 | tripartite motif containing 21 | 1,2879 |
| 347 | 16834071 | RARA | retinoic acid receptor, alpha | 1,3030 |
| 348 | 16680284 | CCNL2 | cyclin L2 | 1,2381 |
| 349 | 16938899 | MLH1 | mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli) | -1,1777 |
| 350 | 16925239 | DONSON | downstream neighbor of SON | -1,1777 |
| 351 | 17012804 | MYB | v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian) | -2,8656 |
| 352 | 16851427 | CABLES1 | Cdk5 and Abl enzyme substrate 1 | -2,4560 |
| 353 | 16769144 | SYCP3 | synaptonemal complex protein 3 | -2,4411 |
| 354 | 16841852 | FLCN /// PLD6 | folliculin /// phospholipase D family, member 6 /// | -2,0191 |
| 355 | 16845126 | STAT3 | signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor) | 1,8218 |
| 356 | 16693187 | TDRKH | tudor and KH domain containing | 1,9796 |
| 357 | 16930707 | MEI1 | meiosis inhibitor 1 | 2,3181 |
| 358 | 16885118 | RALB | v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein) | 1,5882 |
| 359 | 16701748 | GTPBP4 | GTP binding protein 4 | -1,6100 |
| 360 | 16836492 | PRR11 | proline rich 11 | 1,5534 |
| 361 | 16669389 | PHGDH | phosphoglycerate dehydrogenase | -1,5170 |

| | | | | |
|-----|----------|----------------|--|---------|
| 362 | 17080946 | KIAA0196 | KIAA0196 | 1,4631 |
| 363 | 16661567 | PHACTR4 | phosphatase and actin regulator 4 | 1,5002 |
| 364 | 16662134 | RBBP4 | retinoblastoma binding protein 4 /// retinoblastoma binding protein 4 pseudogene 1 | -1,4231 |
| 365 | 16908604 | CNPPD1 | cyclin Pas1/PHO80 domain containing 1 | 1,5461 |
| 366 | 16829369 | FANCA | Fanconi anemia, complementation group A | -1,4768 |
| 367 | 16861200 | LIN37 | lin-37 homolog (C. elegans) | 1,6304 |
| 368 | 16722217 | ARNTL | aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like | 1,4248 |
| 369 | 16662430 | AGO4 | argonaute RISC catalytic component 4 | 1,5187 |
| 370 | 17022588 | CDK19 | cyclin-dependent kinase 19 | 1,4895 |
| 371 | 16813286 | CIB1 | calcium and integrin binding 1 (calmyrin) | 1,4220 |
| 372 | 16909958 | PER2 | period circadian clock 2 | -1,4313 |
| 373 | 16694804 | ARHGEF11 | Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11 | 1,4254 |
| 374 | 16879923 | MSH6 | mutS homolog 6 (E. coli) | -1,5196 |
| 375 | 16872443 | SERTAD1 | SERTA domain containing 1 | 1,4736 |
| 376 | 16968765 | HERC5 | HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5 | -1,3810 |
| 377 | 16800173 | CCNDBP1 | cyclin D-type binding-protein 1 | 1,4003 |
| 378 | 17086784 | CENPP /// IPPK | centromere protein P /// inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase | -1,2919 |
| 379 | 17009482 | CENPQ | centromere protein Q | -1,4359 |
| 380 | 16683358 | E2F2 | E2F transcription factor 2 | -1,3198 |
| 381 | 17008595 | UBR2 | ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 2 | 1,3182 |
| 382 | 16701440 | AHCTF1 | AT hook containing transcription factor 1 /// AT hook containing transcription factor 1 pseudogene 1 | -1,3381 |
| 383 | 16982635 | TRIP13 | thyroid hormone receptor interactor 13 | -1,2976 |
| 384 | 16674998 | RNF2 | ring finger protein 2 | -1,3069 |
| 385 | 16921036 | CABLES2 | Cdk5 and Abl enzyme substrate 2 | -1,3217 |
| 386 | 16839606 | MNT | MNT, MAX dimerization protein | -1,2791 |
| 387 | 17076103 | TEX15 | testis expressed 15 | -1,4106 |
| 388 | 16842070 | TOP3A | topoisomerase (DNA) III alpha | -1,2903 |
| 389 | 16742454 | PAK1 | p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1 | 1,2194 |
| 390 | 16979400 | PRDM5 | PR domain containing 5 | 1,2678 |
| 391 | 16986748 | MSH3 | mutS homolog 3 (E. coli) | -1,1882 |
| 392 | 16985614 | CENPH | centromere protein H | -1,2111 |
| 393 | 17105401 | CENPI | centromere protein I | 1,2265 |
| 394 | 17067890 | ZNF703 | zinc finger protein 703 | 1,2442 |
| 395 | 16919044 | RBL1 | retinoblastoma-like 1 (p107) | -1,2598 |
| 396 | 16721126 | RRM1 | ribonucleotide reductase M1 | -1,2163 |
| 397 | 16935517 | CENPM | centromere protein M | -1,2661 |
| 398 | 16724516 | MADD | MAP-kinase activating death domain | 1,2190 |
| 399 | 16800117 | STARD9 | StAR-related lipid transfer (START) domain containing 9 | 1,3175 |
| 400 | 16950017 | PAK2 | p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2 | -1,1876 |
| 401 | 16768857 | CDK17 | cyclin-dependent kinase 17 | 1,1862 |
| 402 | 16933931 | PES1 | pescadillo ribosomal biogenesis factor 1 | -1,2236 |
| 403 | 16937505 | FANCD2 | Fanconi anemia, complementation group D2 | 1,1798 |
| 404 | 16669796 | TXNIP | thioredoxin interacting protein /// thioredoxin-interacting protein-like | 2,3283 |

| | | | | |
|-----|----------|----------|---|---------|
| 405 | 16801179 | MAPK6 | mitogen-activated protein kinase 6 | -1,6958 |
| 406 | 16664118 | NASP | nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) /// nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) | -1,6875 |
| 407 | 16740956 | POLD4 | polymerase (DNA-directed), delta 4, accessory subunit | 1,6832 |
| 408 | 17008092 | PIM1 | pim-1 oncogene | -1,6148 |
| 409 | 16922584 | CHAF1B | chromatin assembly factor 1, subunit B (p60) | -1,6991 |
| 410 | 16860737 | PDCD2L | programmed cell death 2-like | -1,7191 |
| 411 | 16857258 | UHRF1 | ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1 /// ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1 | -1,5932 |
| 412 | 16962493 | RFC4 | replication factor C (activator 1) 4, 37kDa | -1,3639 |
| 413 | 16713230 | PARD3 | par-3 partitioning defective 3 homolog (<i>C. elegans</i>) | 1,3869 |
| 414 | 16857192 | CHAF1A | chromatin assembly factor 1, subunit A (p150) | -1,4802 |
| 415 | 17058617 | RFC2 | replication factor C (activator 1) 2, 40kDa | -1,4019 |
| 416 | 17002777 | STK10 | serine/threonine kinase 10 | 1,4566 |
| 417 | 16884956 | STEAP3 | STEAP family member 3, metalloreductase | -1,4579 |
| 418 | 16856980 | HMG20B | high mobility group 20B | 1,3061 |
| 419 | 16679411 | EXO1 | exonuclease 1 | -1,3441 |
| 420 | 16794256 | ERH | enhancer of rudimentary homolog (<i>Drosophila</i>) | -1,3507 |
| 421 | 16985353 | ERBB2IP | erb2 interacting protein | 1,3285 |
| 422 | 17005234 | E2F3 | E2F transcription factor 3 | 1,2681 |
| 423 | 16833263 | LIG3 | ligase III, DNA, ATP-dependent /// ligase III, DNA, ATP-dependent | 1,2552 |
| 424 | 16845172 | PSMC3IP | PSMC3 interacting protein | -1,3339 |
| 425 | 17007910 | MAPK13 | mitogen-activated protein kinase 13 | 1,2889 |
| 426 | 17068093 | TACC1 | transforming, acidic coiled-coil containing protein 1 | -1,3935 |
| 427 | 16716027 | ANXA11 | annexin A11 | 1,2534 |
| 428 | 17046041 | IKZF1 | IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros) | 1,2886 |
| 429 | 17104082 | APEX2 | APEX nuclease (apurinic/aprimidinic endonuclease) 2 | -1,2737 |
| 430 | 16828153 | TXNL4B | thioredoxin-like 4B | -1,3035 |
| 431 | 16901593 | sep-01 | septin 10 | 1,3109 |
| 432 | 16969414 | TET2 | tet methylcytosine dioxygenase 2 | 1,2227 |
| 433 | 16773946 | RFC3 | replication factor C (activator 1) 3, 38kDa | -1,3430 |
| 434 | 16702685 | SUV39H2 | suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (<i>Drosophila</i>) | -1,2245 |
| 435 | 16886503 | RIF1 | RAP1 interacting factor homolog (yeast) | -1,3189 |
| 436 | 17009918 | PTP4A1 | protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 | -1,1934 |
| 437 | 17109716 | RPS6KA3 | ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3 | -1,2300 |
| 438 | 17057174 | POLD2 | polymerase (DNA directed), delta 2, accessory subunit | -1,1924 |
| 439 | 16960517 | SIAH2 | siah E3 ubiquitin protein ligase 2 | -1,2119 |
| 440 | 16916901 | RASSF2 | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2 | -1,1804 |
| 441 | 16937035 | ARL8B / | ADP-ribosylation factor-like 8B | -1,2276 |
| 442 | 17077135 | RB1CC1 | RB1-inducible coiled-coil 1 | 1,2178 |
| 443 | 16704320 | RASSF4 | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4 | 1,1767 |
| 444 | 16757687 | RFC5 | replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa | -1,2192 |
| 445 | 17098932 | C9orf114 | chromosome 9 open reading frame 114 | -1,1867 |
| 446 | 16882304 | USP39 | ubiquitin specific peptidase 39 | -1,1906 |
| 447 | 16915173 | RBM38 | RNA binding motif protein 38 | -1,1508 |

software (22) (Biosoft, Ferguson, MO, USA), which calculates a combination index (CI) with the following interpretation: $CI > 1$: antagonistic effect, $CI = 1$: additive effect and $CI < 1$: synergistic effect.

Immunofluorescence study to quantify monopolar spindles *in vitro*. MM.1S cells were plated on poly-L-lysine-coated coverslips, allowed to recover overnight and then treated with PD, F or PDF or control vehicle for 24 h. After fixation in cold methanol for 5 min, cells were blocked and permeabilized in a 5% bovine serum albumin (BSA) 0.01% Tween 20 containing solution, and incubated overnight with a monoclonal primary anti- α -tubulin antibody (Sigma). Coverslips were washed before staining with Alexa Fluor 488 conjugated anti-mouse IgG secondary antibody (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Finally, coverslips were briefly incubated in a DAPI solution (Sigma) to identify nuclei, and mounted in Vectashield medium. The number of monopolar spindles was evaluated in at least 10 randomly selected fields with the 63x objective. At least 100 cells were counted for each treatment.

Western blot. Isolation of total protein or nuclear, cytosolic and mitochondrial protein fractions, as well as western blot procedures were performed as described (23). Primary antibodies used in western blot were purchased from Santa Cruz Biotechnology (anti-Mcl-1; Santa Cruz, CA, USA), Calbiochem (anti-cytochrome C; Billerica, MA, USA). All other antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were acquired from GE Healthcare (Little Chalfont, UK).

Gene silencing with siRNA. MM.1S cells were transiently transfected with either 100 nM non-targeting control short interfering RNA (NT-siRNA) or 100 nM ON

TARGET plus SMART pool siRNA targeting human BAX (Bax-siRNA; Dharmacon, Lafayette, CO, USA) using the Nucleofector II system (Lonza, Allendale, NJ, USA). After 24-48 h of siRNA transfection, diminished Bax expression was confirmed by western blot.

Animal models. In the human subcutaneous plasmacytoma model, CB17- SCID mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) were subcutaneously injected into the right flank with 3×10^6 MM.1S cells that had been resuspended in 100 μ L of RPMI-1640 medium and 100 μ L of Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). When tumors became palpable, mice were randomized to the control group (receiving the vehicle alone-PBS) or the different treatment groups. Tumor volume was measured with calipers, and changes in volume and clinical signs in the mice were monitored as previously described (20, 24). Animal experiments were conducted according to institutional guidelines for the use of Laboratory Animals and after acquiring permission from the local Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of Salamanca.

Histological and immunohistochemistry (IHC) analyses. Representative tumor fractions were fixed in formalin, paraffin-embedded, cut into 3- μ m sections, and either stained with hematoxylin and eosin or prepared for IHC, which was performed as previously described (24). For Bax staining, a primary anti-Bax antibody was used (Cell Signaling, Boston, MA, USA), together with the EnVision anti-mouse/rabbit peroxidase complexes (Dako, Glostrup, Denmark). Peroxidase activity was identified using the 3,3'-diaminobenzidine MAPO system (Ventana Medical Systems, Roche, Tucson, AZ, USA). Finally, sections were subsequently counterstained with hematoxylin and analyzed by standard light microscopy.

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) was

performed using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany). Sections were counterstained with DAPI and data were visualized by confocal laser microscopy (Leica TCS SP2). The number of TUNEL⁺ cells were evaluated in 10 randomly selected fields with the 60x objective for each experimental condition. These procedures were carried out by independent personnel of the Comparative Pathology Unit of our center. Disagreements between measurements were resolved by consensus.

RNA isolation, cDNA synthesis and microarray hybridization and analysis.

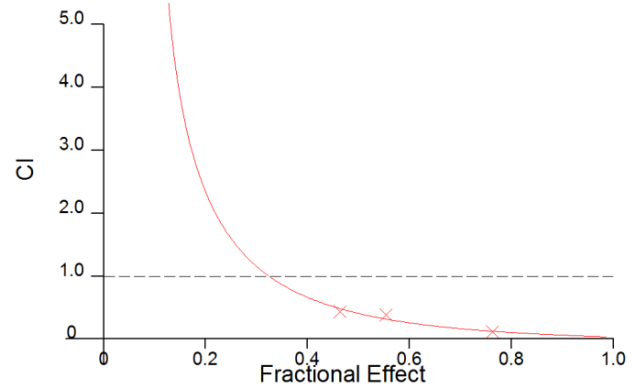
Tumors and MM1.S cells (n=3 for each treatment) were homogenized in RLT Plus buffer (Qiagen). Total RNA was isolated using an RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen), column-purified (Qiagen, RNeasy mini kit) and processed for hybridization of Human Gene 2.0 ST arrays (Affymetrix) following the manufacturer's instructions. The raw intensity data were preprocessed using the RMA algorithm (25) implemented in the Affymetrix Expression Console, version 1.4.1.46. Differentially expressed genes were identified using the significance analysis of microarrays (SAM) algorithm (26), version 4.01, selecting all genes with a value of $q < 0.05$. Data were mined to identify ontological categories (GO, Gene Ontology) that were significantly altered with respect to control at biological process level 5 in samples treated with PD, F and PDF using the DAVID Database (<https://david.ncifcrf.gov/>). Microarray data are available through the GEO repository database (Accession number GSE94341).

Statistical analyses. Statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics v.21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Thalidomide + Dexamethasone + Filanesib

CI For experimental values

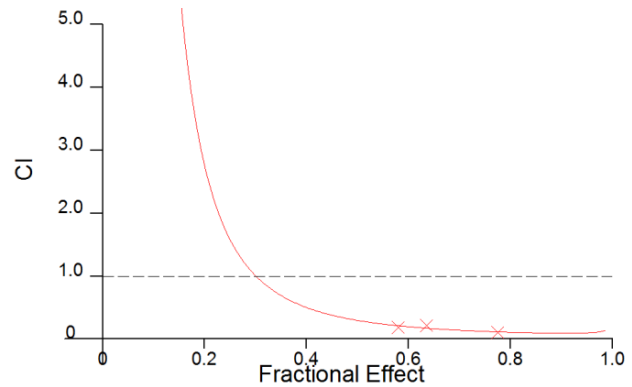
| T (nM) | D (nM) | F (nM) | Fa | CI |
|-----------|-----------|-----------|----------|-------|
| 25000 | 2.5 | 0.2 | 0.464092 | 0.435 |
| 50000 | 5 | 0.4 | 0.554807 | 0.390 |
| 100000 | 10 | 0.8 | 0.763846 | 0.112 |



Lenalidomide + Dexamethasone + Filanesib

CI For experimental values

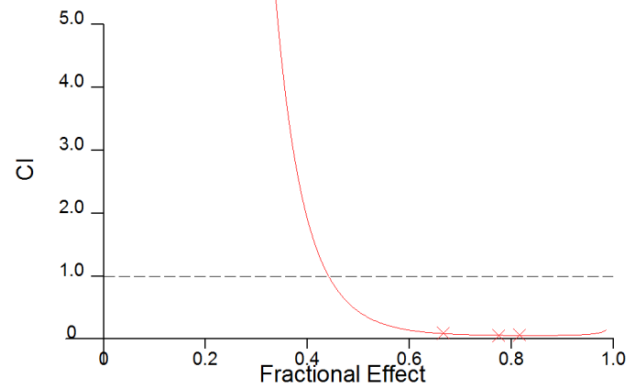
| L (nM) | D (nM) | F (nM) | Fa | CI |
|-----------|-----------|-----------|----------|-------|
| 125 | 2.5 | 0.2 | 0.580561 | 0.189 |
| 250 | 5 | 0.4 | 0.636008 | 0.217 |
| 500 | 10 | 0.8 | 0.775603 | 0.103 |



Pomalidomide + Dexamethasone + Filanesib

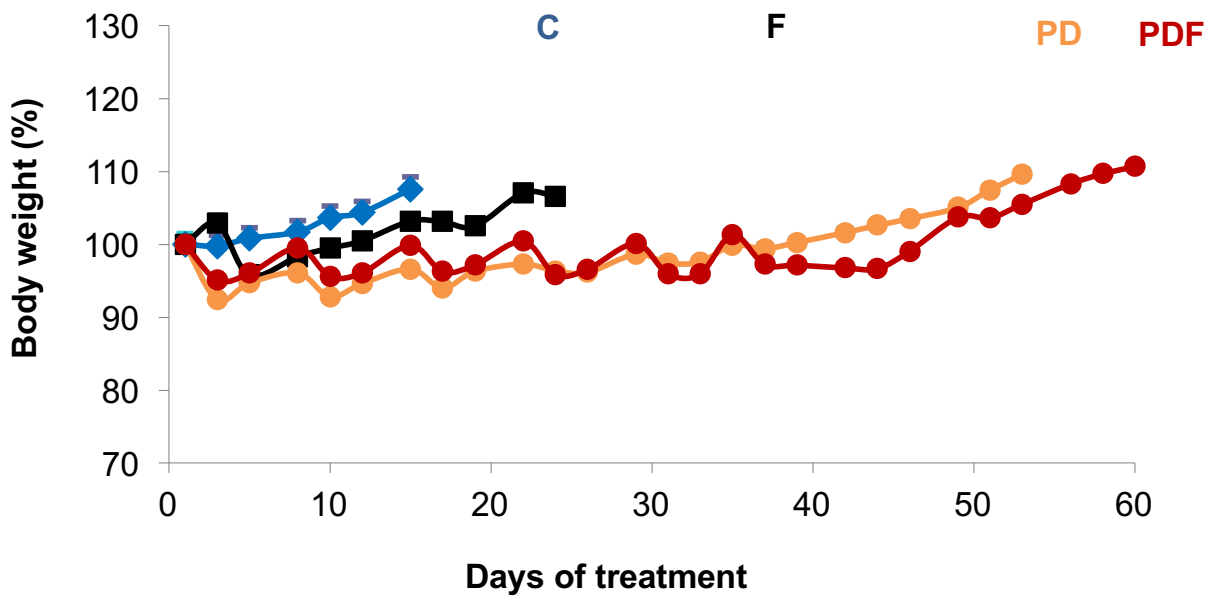
CI For experimental values

| P (nM) | D (nM) | F (nM) | Fa | CI |
|-----------|-----------|-----------|----------|-------|
| 125 | 2.5 | 0.2 | 0.666667 | 0.095 |
| 250 | 5 | 0.4 | 0.775603 | 0.051 |
| 500 | 10 | 0.8 | 0.816699 | 0.063 |

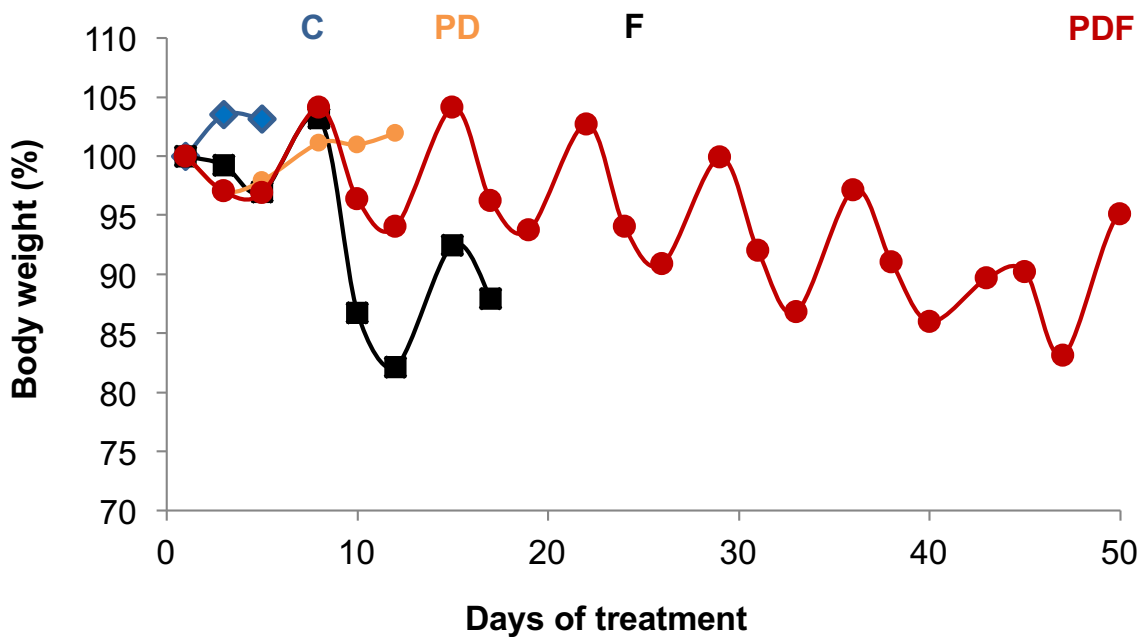


Synergism analysis of the triple combinations TDF, LDF and PDF on the MM.1S cell line using a constant ratio combination design. In the left panel, doses and units used for each drug, together with the obtained fractional effect or fraction of cells affected (Fa) and the combination indexes (CI) calculated by the Calcsyn software for each combination data point is given. For the PDF and LDF combinations, a constant ratio of 62.5 : 1.25 : 0.1 was used; for the TDF combination, the constant ratio between drugs was 12500 : 1.25 : 0.1. On the right panel, the Fa-CI plot is shown for each triple combination, since the Calcsyn program allows an algebraic estimation of the CIs along the Fa when using the constant ratio drug combination design. In these Fa-CI plots, CIs obtained for experimental data points are shown.

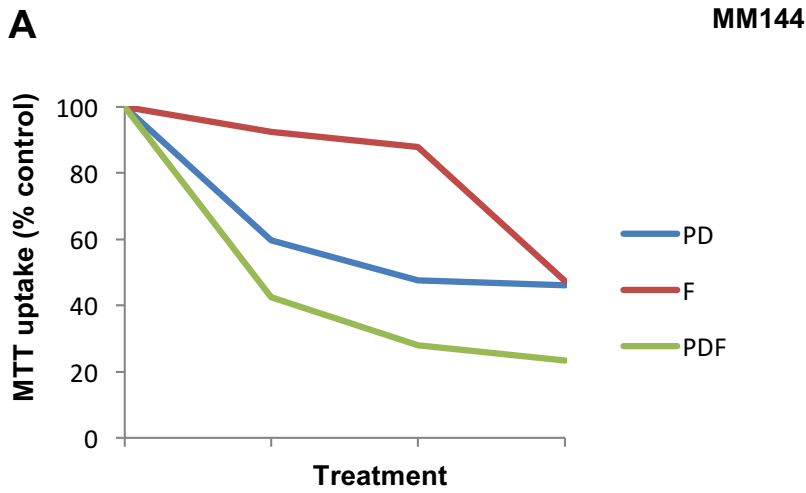
A



B

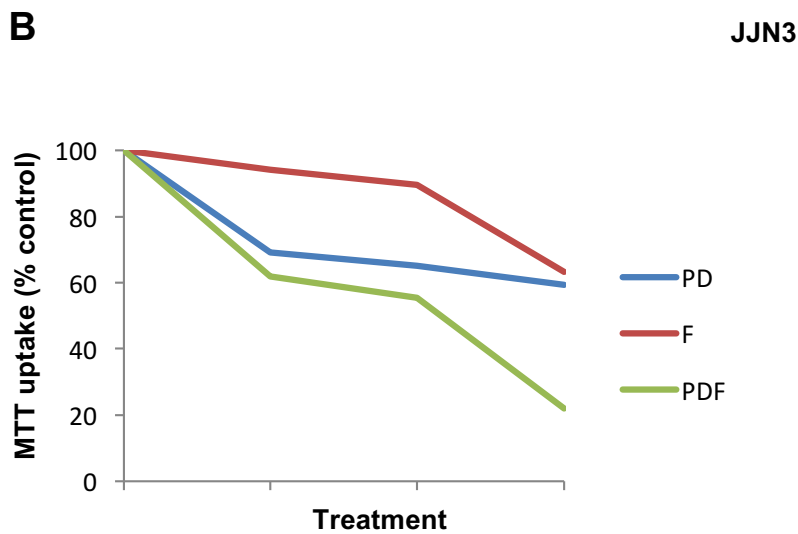


Effect of intraperitoneal administration of PDF on body weight in xenograft mouse models of MM. A & B) Average body weight of mice with small (mean volume around 125 mm³) (A) or large (mean volume around 2500 mm³) (B) plasmacytomas monitored over the treatment period. The percentage weight at each day of treatment was calculated considering day 1 for control mice (C) as 100%. Data are expressed as the mean \pm SEM.



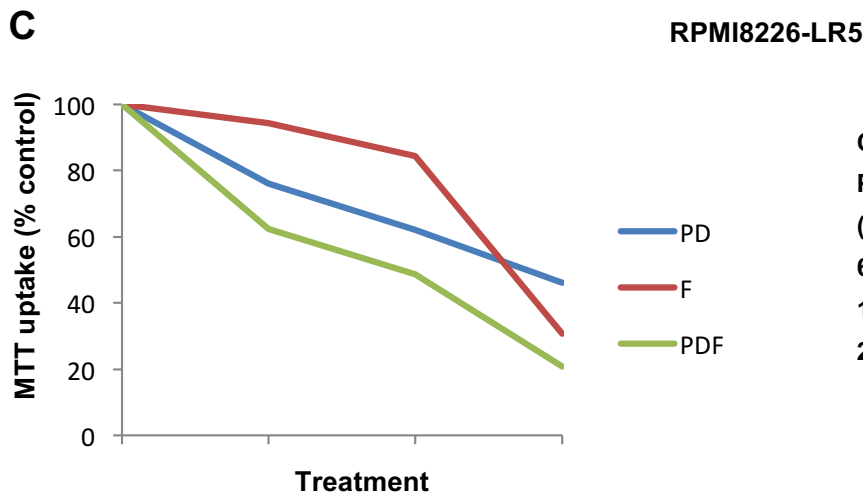
CI For experimental values

| P (nM) | D (nM) | F (nM) | Fa | CI |
|--------|--------|--------|---------|-------|
| 62.5 | 1.25 | 0.15 | 0.57395 | 0.220 |
| 125 | 2.5 | 0.3 | 0.72003 | 0.293 |
| 250 | 5 | 0.3 | 0.76631 | 0.511 |



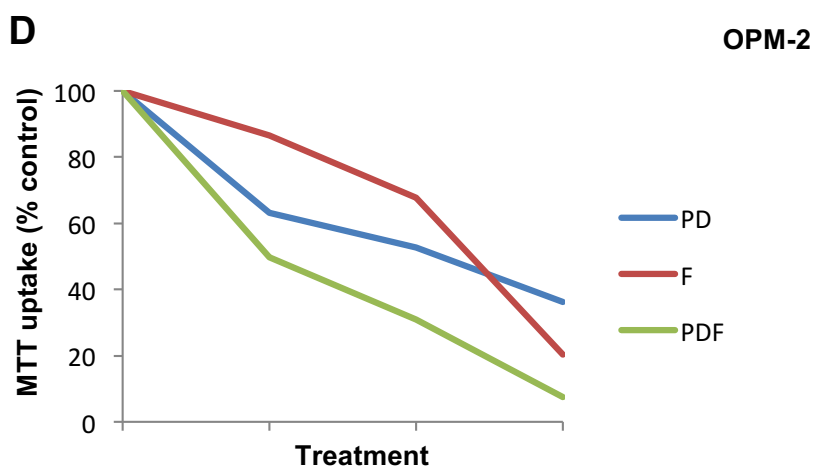
CI For experimental values

| P (nM) | D (nM) | F (nM) | Fa | CI |
|--------|--------|--------|---------|---------|
| 62.5 | 1.25 | 0.15 | 0.37984 | 201.485 |
| 125 | 2.5 | 0.3 | 0.44550 | 17.610 |
| 250 | 5 | 0.3 | 0.78000 | 0.452 |



CI For experimental values

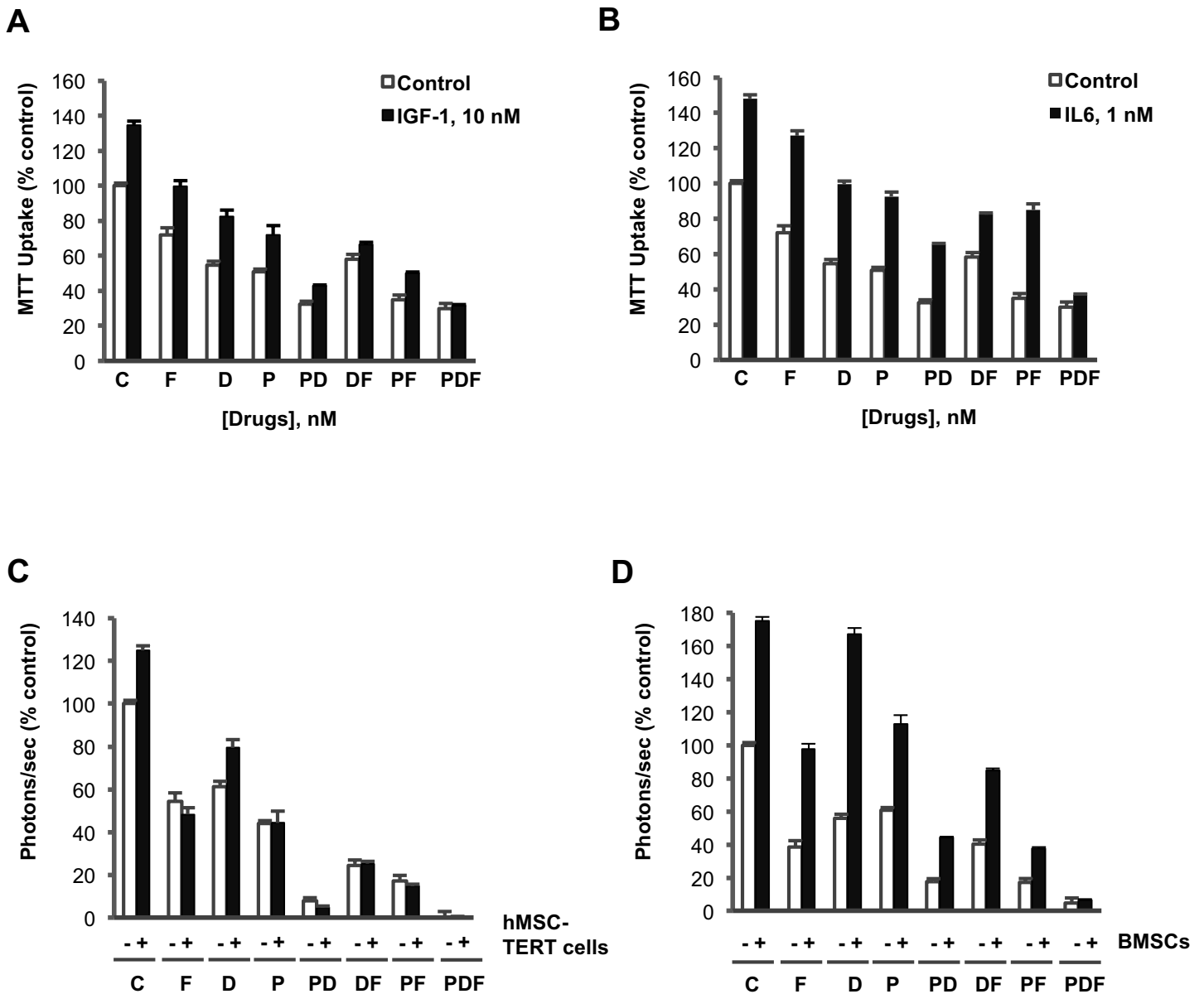
| P (nM) | D (nM) | F (nM) | Fa | CI |
|--------|--------|--------|---------|-------|
| 62.5 | 1.25 | 0.15 | 0.37681 | 0.392 |
| 125 | 2.5 | 0.3 | 0.51206 | 0.606 |
| 250 | 5 | 0.3 | 0.79188 | 0.684 |



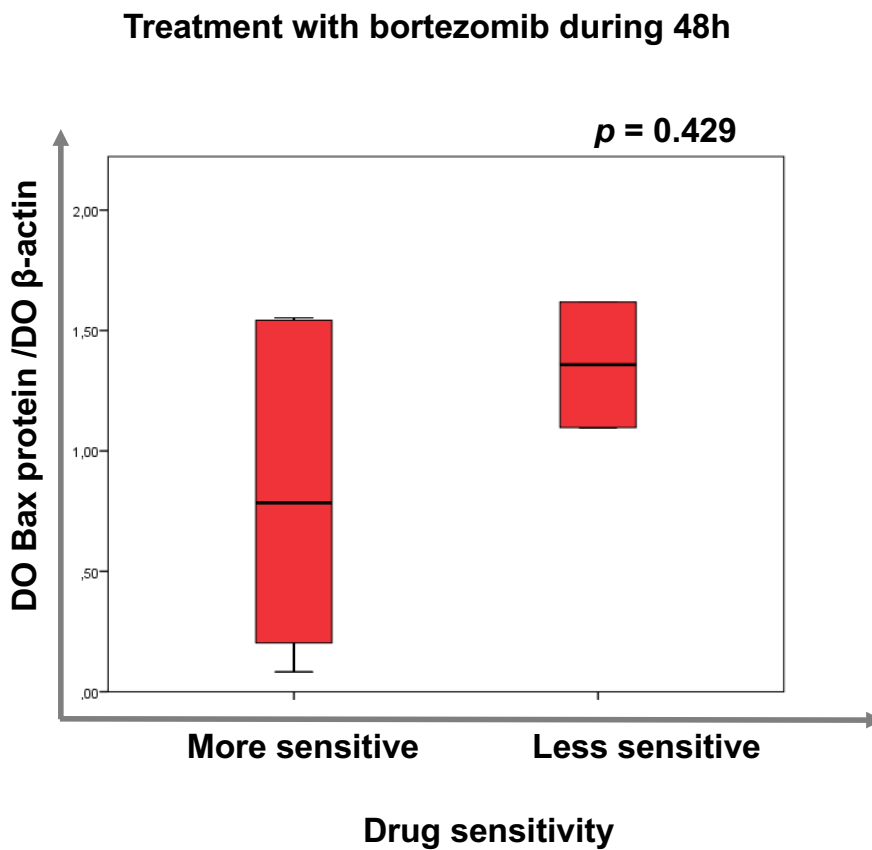
CI For experimental values

| P (nM) | D (nM) | F (nM) | Fa | CI |
|--------|--------|--------|---------|-------|
| 62.5 | 1.25 | 0.15 | 0.50241 | 0.376 |
| 125 | 2.5 | 0.3 | 0.69024 | 0.469 |
| 250 | 5 | 0.3 | 0.92516 | 0.356 |

Supplementary Figure 3. Activity and synergism analysis of the PDF combination on the MM144 (A), JJN3 (B), RPMI8226-LR5 (C) and OPM-2 (D) cell lines. For each cell line, the activity of the triple combination with the indicated doses the drugs for each data point as assessed by MTT assay after 48 hours of culture is shown in the left handside. Note that a constant ratio drug combination design of 62.5 : 1.25 : 0.15 is maintained for the PDF combination. On the right handside, the correspondent CI values calculated by the Calcsyn program for each data point are also shown.



PDF overcomes the protective effects of growth factors and stroma. A & B) Cell viability was analyzed by MTT metabolism in MM.1S cells preincubated with 10 nM IGF-1 (A) or 1 nM IL-6 (B) and then cultured with the indicated conditions for 48 h. C & D) Bioluminescence signal of MM.1S-Luc cells treated for 48 h at indicated conditions in the presence or absence of either hMSC-TERT cells (C) or BMSCs (D) determined by bioluminescence after luciferin addition. Data are summarized as the mean \pm SD (n=4). Results are shown as a percentage of control.



Bortezomib efficacy was not dependent on basal Bax protein levels. Relation between basal levels of Bax protein (determined by densitometry of bands using imageJ software and using levels of β -actin as loading control) and drug sensitivity to bortezomib was estimated according to IC50 for 48 h with $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test).

Supplementary Tables

Supplementary Table 1. List of the most (top 100) differentially deregulated genes for the PDF treatment *in vitro* vs the control condition ordered by q-value. Gene identification and fold change with respect to control are given (78/100 genes were upregulated -red- and 22/100 were downregulated -green-).

| Position (by q-value) | Affimetrix probe set | Gene Symbol | Gene Title | Fold Change |
|-----------------------|----------------------|-----------------------------------|--|-------------|
| 1 | 16705961 | <i>DDIT4</i> | DNA-damage-inducible transcript 4 | 24,5686 |
| 2 | 17010760 | <i>NT5E</i> | 5'-nucleotidase, ecto (CD73) | 5,2666 |
| 3 | 17113362 | <i>CAPN6</i> | calpain 6 | 5,6308 |
| 4 | 16889636 | <i>BMPR2</i> | bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase) | 5,5188 |
| 5 | 16749583 | <i>FAR2</i> | fatty acyl CoA reductase 2 | 5,4656 |
| 6 | 16947173 | <i>MME</i> | membrane metallo-endopeptidase | 4,2176 |
| 7 | 17010354 | <i>CD109</i> | CD109 molecule | 5,5590 |
| 8 | 17018497 | <i>FKBP5</i> | FK506 binding protein 5 | 3,2047 |
| 9 | 16874339 | <i>RRAS</i> | related RAS viral (r-ras) oncogene homolog | 6,4109 |
| 10 | 16676693 | <i>PFKFB2</i> | 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2 | 3,6761 |
| 11 | 16904425 | <i>GRB14</i> | growth factor receptor-bound protein 14 | 3,2670 |
| 12 | 16833327 | <i>SLFN5</i> | schlafen family member 5 | 4,3888 |
| 13 | 16712086 | <i>ITGA8</i> | integrin, alpha 8 | -3,3440 |
| 14 | 16705011 | <i>DKK1</i> | dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 | 4,5034 |
| 15 | 17112349 | <i>CYSLTR1</i> | cysteinyl leukotriene receptor 1 | 5,3958 |
| 16 | 16662623 | <i>ZC3H12A</i> | zinc finger CCCH-type containing 12A | 3,2980 |
| 17 | 16897026 | <i>ZFP36L2</i> | ZFP36 ring finger protein-like 2 | 3,0419 |
| 18 | 16947715 | <i>SERPINI1</i> | serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1 | 4,2268 |
| 19 | 16676183 | <i>ATP2B4</i> | ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4 | 4,5334 |
| 20 | 16927283 | <i>USP41</i> | ubiquitin specific peptidase 41 | 3,4967 |
| 21 | 17012804 | <i>MYB</i> | v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian) | -2,8656 |
| 22 | 16807324 | <i>BMF</i> | Bcl2 modifying factor | 4,0062 |
| 23 | 16998850 | <i>EPB41L4A</i> | erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4A | 3,2604 |
| 24 | 16830577 | <i>CD68</i> /// <i>SNORA67</i> | CD68 molecule /// small nucleolar RNA, H/ACA box 67 | 2,7473 |
| 25 | 17024079 | <i>MAP3K5</i> | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 | 3,0983 |
| 26 | 17004167 | <i>IRF4</i> | interferon regulatory factor 4 | -2,5559 |
| 27 | 16673191 | <i>PBX1</i> | pre-B-cell leukemia homeobox 1 | 2,6468 |
| 28 | 17022529 | <i>WASF1</i> | WAS protein family, member 1 | 5,6603 |
| 29 | 16855898 | <i>CBLN2</i> | cerebellin 2 precursor | -5,6554 |

| | | | | |
|----|----------|--------------------------------------|--|---------|
| 30 | 17066083 | <i>PDGFRL</i> | platelet-derived growth factor receptor-like | 3,1682 |
| 31 | 16694617 | <i>IQGAP3</i> | IQ motif containing GTPase activating protein 3 | 3,2017 |
| 32 | 16799357 | <i>EIF2AK4</i> | eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4 | 2,3497 |
| 33 | 16881031 | <i>ANTXR1</i> | anthrax toxin receptor 1 | 3,4873 |
| 34 | 16843602 | <i>CCL3L3</i> | chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3 | -2,9111 |
| 35 | 17087588 | <i>MSANTD3</i> /// <i>TMEFF1</i> | Myb/SANT-like DNA-binding domain containing 3 /// transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1 | -2,5071 |
| 36 | 16881069 | <i>ANXA4</i> | annexin A4 | 2,8551 |
| 37 | 16804490 | <i>ISG20</i> | interferon stimulated exonuclease gene 20kDa | 2,6911 |
| 38 | 17062280 | <i>AASS</i> | aminoadipate-semialdehyde synthase | 2,9670 |
| 39 | 16715361 | <i>P4HA1</i> | prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I | 2,8670 |
| 40 | 16851427 | <i>CABLES1</i> | Cdk5 and Abl enzyme substrate 1 | -2,4560 |
| 41 | 16849349 | <i>TMC6</i> /// <i>TNRC6C-AS1</i> | transmembrane channel-like 6 /// TNRC6C antisense RNA 1 | 2,9446 |
| 42 | 16961806 | <i>GNB4</i> | guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4 | 2,4425 |
| 43 | 16963241 | <i>TFRC</i> | transferrin receptor (p90, CD71) | -2,2769 |
| 44 | 17078558 | <i>PAG1</i> | phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1 | 2,1537 |
| 45 | 16873007 | <i>ETHE1</i> | ethylmalonic encephalopathy 1 | 2,5653 |
| 46 | 16683445 | <i>FUCA1</i> | fucosidase, alpha-L- 1, tissue | 2,6554 |
| 47 | 17113147 | <i>TSC22D3</i> | TSC22 domain family, member 3 | 3,1506 |
| 48 | 16688339 | <i>WLS</i> | wntless homolog (Drosophila) | 2,1945 |
| 49 | 16718719 | <i>KIAA1598</i> | KIAA1598 | 2,4298 |
| 50 | 16781168 | <i>LOC440149</i> | uncharacterized LOC440149 | 2,9906 |
| 51 | 16933398 | <i>CRYBB1</i> | crystallin, beta B1 | -2,1842 |
| 52 | 16977052 | <i>CXCL10</i> | chemokine (C-X-C motif) ligand 10 | -4,4776 |
| 53 | 16706200 | <i>VCL</i> | vinculin | 2,7055 |
| 54 | 16982147 | <i>CCDC110</i> | coiled-coil domain containing 110 | -2,7509 |
| 55 | 16743091 | <i>FZD4</i> | frizzled family receptor 4 | 2,9608 |
| 56 | 16843578 | <i>CCL3</i> | chemokine (C-C motif) ligand 3 /// c-C motif chemokine 3-like | -2,4436 |
| 57 | 16690566 | <i>SORT1</i> | sortilin 1 | 2,2137 |
| 58 | 16676343 | <i>MDM4</i> | Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse) | 3,5764 |
| 59 | 16773662 | <i>ALOX5AP</i> | arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein | 2,9648 |
| 60 | 16732386 | <i>OAF</i> | OAF homolog (Drosophila) | -1,9394 |
| 61 | 17085760 | <i>MAMDC2</i> | MAM domain containing 2 | 2,2349 |
| 62 | 16938562 | <i>TGFBR2</i> | transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) | 2,3666 |
| 63 | 17086193 | <i>PSAT1</i> | phosphoserine aminotransferase 1 | -2,5800 |
| 64 | 16663033 | <i>SMAP2</i> | small ArfGAP2 | 2,1630 |
| 65 | 16849238 | <i>RHBDF2</i> | rhomoid 5 homolog 2 (Drosophila) | 2,4000 |
| 66 | 16944665 | <i>DTX3L</i> | deltex 3-like (Drosophila) | 2,3204 |
| 67 | 16749398 | <i>STK38L</i> | serine/threonine kinase 38 like | -2,2405 |
| 68 | 16834766 | <i>GRN</i> | granulin | 2,2726 |

| | | | | |
|-----|----------|--------------------------------|---|---------|
| 69 | 16862118 | <i>LGALS17A</i> | Charcot-Leyden crystal protein pseudogene | -3,1969 |
| 70 | 16836214 | <i>TOM1L1</i> | target of myb1 (chicken)-like 1 | 2,5848 |
| 71 | 16833876 | <i>GRB7</i> | growth factor receptor-bound protein 7 | 2,0959 |
| 72 | 16729128 | <i>SERPINH1</i> | serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, collagen binding protein 1 | 2,5906 |
| 73 | 16987531 | <i>ERAP2</i> | endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 | 2,0616 |
| 74 | 16668582 | <i>CD53</i> | CD53 molecule | 2,1044 |
| 75 | 16929529 | <i>TOM1</i> | target of myb1 (chicken) | 2,2001 |
| 76 | 16879721 | <i>EPAS1</i> | endothelial PAS domain protein 1 | 2,3965 |
| 77 | 16869643 | <i>GIPC1</i> | GIPC PDZ domain containing family, member 1 | 2,1892 |
| 78 | 16836528 | <i>YPEL2</i> | yippee-like 2 (Drosophila) | 2,2656 |
| 79 | 16836697 | <i>BCAS3</i> | breast carcinoma amplified sequence 3 | 2,0897 |
| 80 | 16903140 | <i>CXCR4</i> | chemokine (C-X-C motif) receptor 4 | 2,0658 |
| 81 | 16999245 | <i>PPIC</i> | peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C) | 2,1949 |
| 82 | 16692918 | <i>FAM63A</i> | family with sequence similarity 63, member A | 2,0728 |
| 83 | 16934045 | <i>PIK3IP1</i> | phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1 | 2,9113 |
| 84 | 16849379 | <i>TK1</i> | thymidine kinase 1, soluble | 2,0123 |
| 85 | 16834395 | <i>TUBG2</i> | tubulin, gamma 2 | 2,4750 |
| 86 | 16801557 | <i>CCNB2</i> | cyclin B2 | 1,9254 |
| 87 | 16716918 | <i>BLNK</i> | B-cell linker | 2,0808 |
| 88 | 16987125 | <i>POLR3G</i> | polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kD) | -2,5603 |
| 89 | 16825154 | <i>ARHGAP17</i> | Rho GTPase activating protein 17 | 2,2649 |
| 90 | 16769144 | <i>SYCP3</i> | synaptonemal complex protein 3 | -2,4411 |
| 91 | 17023658 | <i>MOXD1</i> | monooxygenase, DBH-like 1 | 2,5144 |
| 92 | 16903090 | <i>MCM6</i> | minichromosome maintenance complex component 6 | -2,0534 |
| 93 | 16687352 | <i>LRP8</i> | low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor | -2,2047 |
| 94 | 16841852 | <i>FLCN</i> /// <i>PLD6</i> | folliculin /// phospholipase D family, member 6 | -2,0191 |
| 95 | 16968735 | <i>HERC6</i> | HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6 | 2,2178 |
| 96 | 16674973 | <i>C1orf21</i> | chromosome 1 open reading frame 21 | 2,0368 |
| 97 | 16669796 | <i>TXNIP</i> | thioredoxin interacting protein /// thioredoxin-interacting protein-like | 2,3283 |
| 98 | 16875297 | <i>TMC4</i> | transmembrane channel-like 4 | 1,9228 |
| 99 | 16949759 | <i>HES1</i> | hairy and enhancer of split 1, (Drosophila) | -2,3674 |
| 100 | 16886564 | <i>FMNL2</i> | formin-like 2 | 2,3134 |

Supplementary Table 2. List of the most differentially deregulated genes for the PDF treatment in mouse tumors with respect to control tumors ordered by q-value. Gene identification and fold change with respect to control are given (44/100 genes were upregulated -red- and 56/100 were downregulated -green-).

| Position (by q-value) | Affimetrix probe set | Gene Symbol | Gene Title | Fold change |
|-----------------------|----------------------|-------------------------------------|---|-------------|
| 1 | 17061881 | <i>DOCK4</i> | dedicator of cytokinesis 4 | 2,4679 |
| 2 | 16797421 | <i>IGHG1</i> /// <i>IGHD2-21</i> | immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker) | -3,5417 |
| 3 | 16830202 | <i>XAF1</i> | XIAP associated factor 1 | 3,1376 |
| 4 | 16687618 | <i>DHCR24</i> | 24-dehydrocholesterol reductase | -2,4940 |
| 5 | 17104939 | <i>LOC100506745</i> | protein shisa-5-like | 1,6968 |
| 6 | 16944695 | <i>PARP14</i> | poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14 | 2,5951 |
| 7 | 17053892 | <i>INSIG1</i> | insulin induced gene 1 | -2,0825 |
| 8 | 16764758 | <i>GALNT6</i> | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (GalNAc-T6) | -1,6764 |
| 9 | 16691245 | <i>AMPD1</i> | adenosine monophosphate deaminase 1 | -2,6988 |
| 10 | 16761269 | <i>CLEC7A</i> | C-type lectin domain family 7, member A | 1,5083 |
| 11 | 16798919 | <i>ARHGAP11A</i> | Rho GTPase activating protein 11A | 1,7493 |
| 12 | 16785483 | <i>FUT8</i> /// <i>FUT8-AS1</i> | fucosyltransferase 8 (alpha (1,6) fucosyltransferase) /// FUT8 antisense RNA 1 | 1,4881 |
| 13 | 16693187 | <i>TDRKH</i> | tudor and KH domain containing | 1,7296 |
| 14 | 16966285 | <i>UCHL1</i> / | ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase) /// ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase) | -1,7271 |
| 15 | 16800962 | <i>SLC27A2</i> | solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2 | -2,2404 |
| 16 | 16697695 | <i>KIF14</i> | kinesin family member 14 | 1,7671 |
| 17 | 16815918 | <i>TNFRSF17</i> | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17 | -1,5686 |
| 18 | 16814183 | <i>ARHGDIG</i> | Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) gamma | 2,5266 |
| 19 | 16741501 | <i>DHCR7</i> | 7-dehydrocholesterol reductase | -1,8235 |
| 20 | 16911493 | <i>SPTLC3</i> | serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 3 | 1,8228 |
| 21 | 16927790 | <i>IGLC1</i> /// <i>IGLV3-25</i> | immunoglobulin lambda constant 1 (Mcg marker) | -1,6779 |
| 22 | 16698529 | <i>NUCKS1</i> | nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1 | 1,5015 |
| 23 | 16799492 | <i>LOC100505573</i> | uncharacterized LOC100505573 | 1,9582 |
| 24 | 16927787 | <i>IGLV3-27</i> | immunoglobulin lambda variable 3-27 | -2,1462 |
| 25 | 16891107 | <i>WNT10A</i> | wingless-type MMTV integration site family, member 10A | -1,4580 |
| 26 | 16799577 | <i>CHST14</i> | carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 14 | -1,8400 |
| 27 | 17093245 | <i>AQP3</i> | aquaporin 3 (Gill blood group) | -1,6772 |
| 28 | 16797378 | <i>IGHG1</i> | immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker) | -2,2145 |
| 29 | 16793885 | <i>RAB15</i> | RAB15, member RAS oncogene family | -1,8380 |

| | | | | |
|----|----------|---------------------------|--|---------|
| 30 | 16940593 | <i>P4HTM</i> | prolyl 4-hydroxylase, transmembrane (endoplasmic reticulum) | -1,4433 |
| 31 | 16708249 | <i>SCD</i> | stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase) | -1,9709 |
| 32 | 16844046 | <i>SNORA21 /// RPL23</i> | small nucleolar RNA, H/ACA box 21 /// ribosomal protein L23 | 1,8872 |
| 33 | 17059932 | <i>PON2</i> | paraoxonase 2 | 1,5843 |
| 34 | 16924147 | <i>TPTE</i> | transmembrane phosphatase with tensin homology | 2,0554 |
| 35 | 16698984 | <i>NEK2</i> | NIMA-related kinase 2 | 1,6285 |
| 36 | 16896442 | <i>EIF2AK2</i> | eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2 | 1,6539 |
| 37 | 16844312 | <i>TOP2A</i> | topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa | 1,5883 |
| 38 | 17046094 | <i>RNU1-14P</i> | RNA, U1 small nuclear 14, pseudogene | 2,5165 |
| 39 | 16943184 | <i>ST3GAL6</i> | ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6 | 1,7729 |
| 40 | 17005368 | <i>ALDH5A1</i> | aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1 | -1,7486 |
| 41 | 16949759 | <i>HES1</i> | hairy and enhancer of split 1, (Drosophila) | -2,1112 |
| 42 | 16727570 | <i>C11orf80</i> | chromosome 11 open reading frame 80 | -1,6450 |
| 43 | 16770789 | <i>C12orf49</i> | chromosome 12 open reading frame 49 | -1,5616 |
| 44 | 16833488 | <i>MRM1</i> | mitochondrial rRNA methyltransferase 1 homolog (S. cerevisiae) | -1,4732 |
| 45 | 16855898 | <i>CBLN2</i> | cerebellin 2 precursor | -2,0109 |
| 46 | 17042984 | <i>CHST12</i> | carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 12 | -1,5928 |
| 47 | 16986249 | <i>HMGCR</i> | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase | -1,4571 |
| 48 | 16972950 | <i>ANKRD37</i> | ankyrin repeat domain 37 | -1,4140 |
| 49 | 17017935 | <i>HLA-DOB /// TAP2</i> | major histocompatibility complex, class II, DO beta | -1,5440 |
| 50 | 16733989 | <i>MIR210</i> | microRNA 210 | -1,6391 |
| 51 | 17064135 | <i>PDIA4</i> | protein disulfide isomerase family A, member 4 | -1,3672 |
| 52 | 17104049 | <i>MAGED2 /// SNORA11</i> | melanoma antigen family D, 2 /// small nucleolar RNA, H/ACA box 11 | -2,2135 |
| 53 | 16811638 | <i>SEMA7A</i> | semaphorin 7A, GPI membrane anchor (John Milton Hagen blood group) | -1,5388 |
| 54 | 16835672 | <i>ITGA3</i> | integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor) | -1,6387 |
| 55 | 16830577 | <i>CD68 /// SNORA67</i> | CD68 molecule /// small nucleolar RNA, H/ACA box 67 | 1,9670 |
| 56 | 16677425 | <i>CENPF</i> | centromere protein F, 350/400kDa | 1,7347 |
| 57 | 16748620 | <i>ATF7IP</i> | activating transcription factor 7 interacting protein | 1,4339 |
| 58 | 16675673 | <i>CAMSAP2</i> | calmodulin regulated spectrin-associated protein family, member 2 | 1,6086 |
| 59 | 16659140 | <i>PLOD1</i> | procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 | -1,7806 |
| 60 | 16812517 | <i>LOC388152</i> | golgin A2 pseudogene | -1,3278 |
| 61 | 16837226 | <i>SNORA38B</i> | small nucleolar RNA, H/ACA box 38B | -1,9131 |
| 62 | 16711464 | <i>ANKRD16</i> | ankyrin repeat domain 16 | -1,3960 |
| 63 | 16740524 | <i>RNASEH2C</i> | ribonuclease H2, subunit C | -1,4251 |
| 64 | 16734092 | <i>CEND1</i> | cell cycle exit and neuronal differentiation 1 | -1,4207 |
| 65 | 16825779 | <i>SEPT1</i> | septin 1 | -1,5320 |
| 66 | 16662623 | <i>ZC3H12A</i> | zinc finger CCCH-type containing 12A | -1,4665 |
| 67 | 16844099 | <i>CACNB1</i> | calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit | -1,3520 |
| 68 | 16710906 | <i>ZNF511</i> | zinc finger protein 511 | -1,5987 |
| 69 | 16842850 | <i>DHRS13</i> | dehydrogenase/reductase (SDR family) member 13 | -1,6364 |
| 70 | 16695268 | <i>IGSF8</i> | immunoglobulin superfamily, member 8 | -1,4159 |

| | | | | |
|-----|----------|-----------------------------------|--|---------|
| 71 | 16799690 | <i>SPINT1</i> | serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1 | -1,6686 |
| 72 | 16826019 | <i>C16orf58</i> | chromosome 16 open reading frame 58 | -1,5785 |
| 73 | 17086496 | <i>DAPK1</i> | death-associated protein kinase 1 | -1,5807 |
| 74 | 16686010 | <i>LEPRE1</i> | leucine proline-enriched proteoglycan (leprecan) 1 | -1,4417 |
| 75 | 16661314 | <i>SFN</i> | stratifin | -1,4721 |
| 76 | 16906534 | <i>STAT1</i> | signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa | 1,7165 |
| 77 | 16803006 | <i>LOC729739</i> | peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) pseudogene | 2,0813 |
| 78 | 17102689 | <i>USP9X</i> | ubiquitin specific peptidase 9, X-linked | 1,3614 |
| 79 | 16911283 | <i>PLCB1</i> | phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific) | 1,4544 |
| 80 | 16798801 | <i>ARHGAP11B</i> | Rho GTPase activating protein 11B | 1,8806 |
| 81 | 17023484 | <i>ARHGAP18</i> | Rho GTPase activating protein 18 | 1,3925 |
| 82 | 17045555 | <i>BLVRA</i> | biliverdin reductase A | 1,8577 |
| 83 | 16958124 | <i>PARP9</i> | poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9 | 2,3008 |
| 84 | 16961806 | <i>GNB4</i> | guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4 | 1,9562 |
| 85 | 16692452 | <i>NBPF14</i> /// <i>NBPF8</i> | neuroblastoma breakpoint family, member 14 | 1,9937 |
| 86 | 16759469 | <i>SNORA49</i> | small nucleolar RNA, H/ACA box 49 | 1,9804 |
| 87 | 17012163 | <i>RNU1-18P</i> | RNA, U1 small nuclear 18, pseudogene | 2,2760 |
| 88 | 16923031 | <i>MX1</i> | myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse) | 1,9884 |
| 89 | 16811994 | <i>PEAK1</i> | NKF3 kinase family member | 1,6269 |
| 90 | 16765513 | <i>CBX5</i> | chromobox homolog 5 | 1,3674 |
| 91 | 17021122 | <i>IBTK</i> | inhibitor of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase | 1,4665 |
| 92 | 17050797 | <i>CPED1</i> | cadherin-like and PC-esterase domain containing 1 | 1,5166 |
| 93 | 16718800 | <i>RAB11FIP2</i> | RAB11 family interacting protein 2 (class I) | 1,3790 |
| 94 | 17076346 | <i>PPAPDC1B</i> | phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1B /// NULL | -1,3170 |
| 95 | 16803959 | <i>LOC388152</i> | golgin A2 pseudogene /// chondroitin sulfate proteoglycan 4 pseudogene 8 | -1,2939 |
| 96 | 16825810 | <i>LOC100506928</i> | uncharacterized LOC100506928 | -1,7497 |
| 97 | 16960647 | <i>DHX36</i> | DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36 | 1,4335 |
| 98 | 16985518 | <i>PIK3R1</i> | phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha) | 1,4323 |
| 99 | 16858386 | <i>LDLR</i> | low density lipoprotein receptor | -1,6679 |
| 100 | 16745236 | <i>H2AFX</i> | H2A histone family, member X | -1,4897 |

Supplementary Table 3. List of the differentially deregulated genes after PDF treatment *in vitro* involved in mitotic and cell cycle processes. Genes are ordered by the number of “GO Biological processes” in which the genes are involved. Shaded genes are potential candidates mediating PDF effects *in vitro*.

| Position by number of mitotic functions | Affimetrix probe set | Gene symbol | Gene Title | Fold Change |
|---|----------------------|----------------------------|--|-------------|
| 1 | 16985599 | <i>CCNB1</i> | cyclin B1 | 1,4632 |
| 2 | 16730845 | <i>ATM</i> /// <i>NPAT</i> | ataxia telangiectasia mutated /// nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus | 1,2661 |
| 3 | 17000439 | <i>CDC25C</i> | cell division cycle 25C | 1,4680 |
| 4 | 16916958 | <i>PCNA</i> | proliferating cell nuclear antigen | -1,6766 |
| 5 | 16931384 | <i>GTSE1</i> | G-2 and S-phase expressed 1 | 1,3133 |
| 6 | 16777502 | <i>CENPJ</i> | centromere protein J | -1,2262 |
| 7 | 16840732 | <i>TP53</i> | tumor protein p53 | -1,1606 |
| 8 | 16753853 | <i>MDM2</i> | MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase | -1,1677 |
| 9 | 16918445 | <i>E2F1</i> | E2F transcription factor 1 | -2,0685 |
| 10 | 16864244 | <i>PRMT1</i> | protein arginine methyltransferase 1 | -1,6228 |
| 11 | 16890915 | <i>RQCD1</i> | RCD1 required for cell differentiation1 homolog (S. pombe) | -1,3821 |
| 12 | 17052776 | <i>CASP2</i> | caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase | -1,4116 |
| 13 | 16802918 | <i>PML</i> | promyelocytic leukemia | 1,3334 |
| 14 | 16676150 | <i>BTG2</i> | BTG family, member 2 | 1,2570 |
| 15 | 16856315 | <i>ARID3A</i> | AT rich interactive domain 3A (BRIGHT-like) | -1,2818 |
| 16 | 16818980 | <i>RBL2</i> | retinoblastoma-like 2 (p130) | 1,2404 |
| 17 | 16858321 | <i>CARM1</i> | coactivator-associated arginine methyltransferase 1 | -1,2243 |
| 18 | 16776905 | <i>TFDP1</i> | transcription factor Dp-1 | -1,2753 |
| 19 | 16977196 | <i>CNOT6L</i> | CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like | -1,1786 |
| 20 | 16665932 | <i>GADD45A</i> | growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha | -1,1798 |
| 21 | 16728261 | <i>CCND1</i> | cyclin D1 | -1,6265 |
| 22 | 16658192 | <i>TP73</i> | tumor protein p73 | -1,7339 |
| 23 | 17076867 | <i>PRKDC</i> | protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide | -1,3638 |
| 24 | 16684089 | <i>RPA2</i> | replication protein A2, 32kDa | -1,2865 |
| 25 | 17104578 | <i>FOXO4</i> | forkhead box O4 | 1,1740 |
| 26 | 16968697 | <i>PKD2</i> | polycystic kidney disease 2 (autosomal dominant) | -1,2382 |
| 27 | 16850517 | <i>NDC80</i> | NDC80 kinetochore complex component | 1,3460 |
| 28 | 16834056 | <i>CDC6</i> | cell division cycle 6 | -1,9952 |
| 29 | 16877473 | <i>GEN1</i> | GEN1 Holliday junction 5' flap endonuclease | 1,2656 |
| 30 | 16766683 | <i>CDK4</i> | cyclin-dependent kinase 4 | -1,4386 |
| 31 | 16872551 | <i>TGFB1</i> | transforming growth factor, beta 1 | 1,5768 |
| 32 | 16677425 | <i>CENPF</i> | centromere protein F, 350/400kDa | 1,6572 |

| | | | | |
|----|----------|---------------------------------|---|---------|
| 33 | 16799426 | <i>BUB1B</i> /// <i>PAK6</i> | BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B /// p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6 | 1,1930 |
| 34 | 16855697 | <i>VPS4B</i> | vacuolar protein sorting 4 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) | 1,2360 |
| 35 | 16927052 | <i>CDC45</i> | cell division cycle 45 | -1,4873 |
| 36 | 16697695 | <i>KIF14</i> | kinesin family member 14 | 1,3877 |
| 37 | 16802152 | <i>RAB11A</i> | RAB11A, member RAS oncogene family | 1,3172 |
| 38 | 16683644 | <i>SYF2</i> | SYF2 homolog, RNA splicing factor (<i>S. cerevisiae</i>) | 1,2579 |
| 39 | 16804902 | <i>BLM</i> | Bloom syndrome, RecQ helicase-like | -1,2068 |
| 40 | 16959325 | <i>TOPBP1</i> | topoisomerase (DNA) II binding protein 1 | -1,1830 |
| 41 | 16924068 | <i>PRMT2</i> | protein arginine methyltransferase 2 | 1,5107 |
| 42 | 16939023 | <i>CTDSPL</i> | CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like | 1,5173 |
| 43 | 16766767 | <i>CTDSP2</i> | CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 2 | 1,3865 |
| 44 | 17010552 | <i>TTK</i> | TTK protein kinase | 1,3546 |
| 45 | 16685165 | <i>CLSPN</i> | claspin | -1,4069 |
| 46 | 16827170 | <i>NAE1</i> | NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1 | -1,2329 |
| 47 | 16868847 | <i>KANK2</i> | KN motif and ankyrin repeat domains 2 | -1,2421 |
| 48 | 16667037 | <i>CDC7</i> | cell division cycle 7 | -1,2438 |
| 49 | 16901755 | <i>BUB1</i> | BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase | 1,2082 |
| 50 | 16817182 | <i>LCMT1</i> | leucine carboxyl methyltransferase 1 | 1,1895 |
| 51 | 16682425 | <i>RCC2</i> | regulator of chromosome condensation 2 | -1,4513 |
| 52 | 17113744 | <i>CUL4B</i> | cullin 4B | 1,3571 |
| 53 | 16781516 | <i>APEX1</i> | APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1 /// APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1 | -1,3733 |
| 54 | 16746992 | <i>CCND2</i> | cyclin D2 | -1,3807 |
| 55 | 16948909 | <i>EIF4G1</i> | eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1 | -1,2739 |
| 56 | 16834812 | <i>DBF4B</i> | DBF4 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) | 1,2511 |
| 57 | 16760649 | <i>PHB2</i> | prohibitin 2 | -1,1737 |
| 58 | 16673191 | <i>PBX1</i> | pre-B-cell leukemia homeobox 1 /// uncharacterized LOC100131938 | 2,6468 |
| 59 | 16834486 | <i>PSME3</i> | proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki) /// proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki) | -1,4365 |
| 60 | 16793225 | <i>DLGAP5</i> | discs, large (<i>Drosophila</i>) homolog-associated protein 5 | 1,4023 |
| 61 | 17053019 | <i>CUL1</i> | cullin 1 | -1,3893 |
| 62 | 16733104 | <i>CHEK1</i> | checkpoint kinase 1 | -1,1916 |
| 63 | 16897026 | <i>ZFP36L2</i> | ZFP36 ring finger protein-like 2 | 3,0419 |
| 64 | 16810933 | <i>TIPIN</i> | TIMELESS interacting protein | -2,1573 |
| 65 | 16698984 | <i>NEK2</i> | NIMA-related kinase 2 | 1,6175 |
| 66 | 16663514 | <i>CDC20</i> | cell division cycle 20 | 1,5784 |
| 67 | 16927198 | <i>RANBP1</i> | RAN binding protein 1 /// RAN binding protein 1 | -1,4861 |
| 68 | 16912871 | <i>CHMP4B</i> | charged multivesicular body protein 4B | -1,2450 |
| 69 | 16843131 | <i>CRLF3</i> | cytokine receptor-like factor 3 | -1,2154 |
| 70 | 17088929 | <i>NEK6</i> | NIMA-related kinase 6 | -1,2410 |
| 71 | 16869570 | <i>PRKACA</i> | protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha | 1,2121 |
| 72 | 16949214 | <i>SEN2</i> | SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 2 | -1,1819 |
| 73 | 17070331 | <i>CHMP4C</i> | charged multivesicular body protein 4C | 2,3538 |

| | | | | |
|-----|----------|------------------------------|---|---------|
| 74 | 16879883 | <i>MSH2</i> | mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli) | -1,7236 |
| 75 | 16911040 | <i>CDC25B</i> | cell division cycle 25B | 1,4458 |
| 76 | 16856959 | <i>FZR1</i> | fizzy/cell division cycle 20 related 1 (Drosophila) | 1,3170 |
| 77 | 16978568 | <i>CENPE</i> | centromere protein E, 312kDa | 1,4784 |
| 78 | 16932008 | <i>BID</i> | BH3 interacting domain death agonist | -1,3007 |
| 79 | 16707221 | <i>KIF20B</i> | kinesin family member 20B | 1,2419 |
| 80 | 16846568 | <i>PPP1R9B</i> | protein phosphatase 1, regulatory subunit 9B /// protein phosphatase 1, regulatory subunit 9B | 1,3048 |
| 81 | 16872089 | <i>SIRT2</i> | sirtuin 2 | 1,2545 |
| 82 | 16734475 | <i>CDKN1C</i> | cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2) | -1,2842 |
| 83 | 16840902 | <i>AURKB</i> | aurora kinase B | 1,1459 |
| 84 | 16912379 | <i>TPX2</i> | TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis) | 1,3027 |
| 85 | 16708468 | <i>BTRC</i> | beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase | 1,3250 |
| 86 | 17045198 | <i>ANLN</i> | anillin, actin binding protein | 1,2004 |
| 87 | 16799793 | <i>NUSAP1</i> | nucleolar and spindle associated protein 1 | 1,1957 |
| 88 | 16845263 | <i>BECN1</i> | beclin 1, autophagy related /// beclin 1, autophagy related | 1,2025 |
| 89 | 16661589 | <i>RCC1</i> /// <i>SNHG3</i> | regulator of chromosome condensation 1 /// small nucleolar RNA host gene 3 (non-protein coding) /// regulator of chromosome condensation 1 /// small nucleolar RNA, H/ACA box 73A | -1,1816 |
| 90 | 16821869 | <i>CDT1</i> | chromatin licensing and DNA replication factor 1 | -1,1822 |
| 91 | 16705942 | <i>ANAPC16</i> | anaphase promoting complex subunit 16 | 1,5602 |
| 92 | 16851022 | <i>CHMP1B</i> | charged multivesicular body protein 1B | 1,3508 |
| 93 | 16964000 | <i>TACC3</i> | transforming, acidic coiled-coil containing protein 3 | 1,3577 |
| 94 | 16770040 | <i>ANAPC7</i> | anaphase promoting complex subunit 7 | -1,1713 |
| 95 | 16760048 | <i>FOXM1</i> | forkhead box M1 | 1,1660 |
| 96 | 16802519 | <i>KIF23</i> | kinesin family member 23 | 1,1471 |
| 97 | 16836214 | <i>TOM1L1</i> | target of myb1 (chicken)-like 1 | 2,5848 |
| 98 | 16769250 | <i>IGF1</i> | insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) | 1,8607 |
| 99 | 16867915 | <i>INSR</i> | insulin receptor | 1,8113 |
| 100 | 16953279 | <i>CDC25A</i> | cell division cycle 25A | -1,6930 |
| 101 | 16844312 | <i>TOP2A</i> | topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa | 1,4734 |
| 102 | 17117724 | <i>PSMD3</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3 /// uncharacterized LOC100505620 | 1,6826 |
| 103 | 16898788 | <i>TGFA</i> | transforming growth factor, alpha | 1,5199 |
| 104 | 16821021 | <i>PSMD7</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7 | -1,4781 |
| 105 | 16892039 | <i>PSMD1</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 1 | -1,3538 |
| 106 | 16935228 | <i>PDGFB</i> | platelet-derived growth factor beta polypeptide | 1,3652 |
| 107 | 16848032 | <i>PSMD12</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12 | -1,3750 |
| 108 | 16833139 | <i>PSMD11</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11 | -1,4914 |
| 109 | 16814825 | <i>EME2</i> / | essential meiotic endonuclease 1 homolog 2 (S. pombe) | -1,3249 |
| 110 | 16714504 | <i>ZWINT</i> | ZW10 interacting kinetochore protein | -1,2939 |
| 111 | 16841982 | <i>TOM1L2</i> | target of myb1-like 2 (chicken) | 1,2654 |
| 112 | 16709140 | <i>SMC3</i> | structural maintenance of chromosomes 3 | -1,2786 |

| | | | | |
|-----|----------|-----------------------------|---|---------|
| 113 | 16690594 | <i>PSMA5</i> | proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5 | -1,2968 |
| 114 | 16905322 | <i>ATF2</i> | activating transcription factor 2 | 1,2576 |
| 115 | 16835797 | <i>EME1</i> | essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (S. pombe) | 1,2923 |
| 116 | 16886919 | <i>PSMD14</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14 /// proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14 | -1,2337 |
| 117 | 16889807 | <i>CD28</i> | CD28 molecule | -1,2173 |
| 118 | 16948871 | <i>PSMD2</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2 | -1,2342 |
| 119 | 17007307 | <i>PSMB9</i> | proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 | 1,2180 |
| 120 | 17049965 | <i>PSMC2</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 2 | -1,2353 |
| 121 | 17090373 | <i>ABL1</i> | c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase | 1,2422 |
| 122 | 16862145 | <i>PSMC4</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4 | -1,1954 |
| 123 | 16738023 | <i>PSMC3</i> | proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3 | -1,2191 |
| 124 | 16784642 | <i>PSMA3</i> | proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3 | -1,2128 |
| 125 | 17067963 | <i>EIF4EBP1</i> | eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 | -1,2605 |
| 126 | 16670850 | <i>PSMB4</i> | proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 4 | -1,1502 |
| 127 | 16829885 | <i>PSMB6</i> | proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 6 | -1,1718 |
| 128 | 16803540 | <i>PSMA4</i> | proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 4 | -1,1959 |
| 129 | 16727802 | <i>RAD9A</i> | RAD9 homolog A (S. pombe) /// uncharacterized LOC100130987 | -1,1552 |
| 130 | 17079293 | <i>CCNE2</i> | cyclin E2 | -1,7937 |
| 131 | 17101622 | <i>OFD1</i> | oral-facial-digital syndrome 1 | 1,5815 |
| 132 | 16984032 | <i>SKP2</i> | S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase | -1,3950 |
| 133 | 16784299 | <i>CDKN3</i> | cyclin-dependent kinase inhibitor 3 | 1,4047 |
| 134 | 17115077 | <i>CETN2</i> | centrin, EF-hand protein, 2 | 1,2935 |
| 135 | 16832852 | <i>ATAD5</i> | ATPase family, AAA domain containing 5 | -1,2622 |
| 136 | 16733952 | <i>HRAS</i> /// <i>HRAS</i> | v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog | -1,2267 |
| 137 | 16801557 | <i>CCNB2</i> | cyclin B2 | 1,9254 |
| 138 | 16860418 | <i>CCNE1</i> | cyclin E1 | -1,7116 |
| 139 | 16840018 | <i>MYBBP1A</i> | MYB binding protein (P160) 1a | -1,6200 |
| 140 | 16736638 | <i>E2F8</i> | E2F transcription factor 8 | -1,3603 |
| 141 | 17102230 | <i>POLA1</i> | polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit | -1,3197 |
| 142 | 17019287 | <i>CUL7</i> | cullin 7 | 1,3046 |
| 143 | 16766590 | <i>DCTN2</i> | dynactin 2 (p50) | 1,2546 |
| 144 | 16744684 | <i>ZNF259</i> | zinc finger protein 259 | -1,1865 |
| 145 | 16992096 | <i>SPDL1</i> | spindle apparatus coiled-coil protein 1 | 1,2281 |
| 146 | 16877007 | <i>KLF11</i> | Kruppel-like factor 11 | -1,9137 |
| 147 | 16823512 | <i>TFAP4</i> | transcription factor AP-4 (activating enhancer binding protein 4) | -1,4977 |
| 148 | 16687188 | <i>ORC1</i> | origin recognition complex, subunit 1 | -1,5622 |
| 149 | 17104484 | <i>KIF4A</i> | kinesin family member 4A | 1,5053 |
| 150 | 16908373 | <i>USP37</i> | ubiquitin specific peptidase 37 | -1,4526 |

| | | | | |
|-----|----------|----------------------|---|---------|
| 151 | 16766318 | PRIM1 | primase, DNA, polypeptide 1 (49kDa) | -1,5116 |
| 152 | 16661117 | CEP85 | centrosomal protein 85kDa | -1,3700 |
| 153 | 16815090 | CCNF | cyclin F | 1,2950 |
| 154 | 16726790 | POLA2 | polymerase (DNA directed), alpha 2, accessory subunit | -1,3007 |
| 155 | 16983412 | FBXL7 | F-box and leucine-rich repeat protein 7 | 1,4379 |
| 156 | 17093480 | DCTN3 | dynactin 3 (p22) | 1,3297 |
| 157 | 17038792 | KIFC1 | kinesin family member C1 | 1,3246 |
| 158 | 17007459 | KIFC1 | kinesin family member C1 /// kinesin family member C1 | 1,3267 |
| 159 | 17041352 | KIFC1 /// RPL12P1 | kinesin family member C1 | 1,3267 |
| 160 | 16666896 | PKN2 | protein kinase N2 | 1,3515 |
| 161 | 17092688 | HAUS6 | HAUS augmin-like complex, subunit 6 | -1,4165 |
| 162 | 16835272 | KPNB1 | karyopherin (importin) beta 1 | -1,3019 |
| 163 | 16852206 | HAUS1 | HAUS augmin-like complex, subunit 1 | 1,3068 |
| 164 | 16858774 | CALR | calreticulin | -1,1904 |
| 165 | 16850477 | TYMS | thymidylate synthetase | -1,2265 |
| 166 | 16744078 | NPAT | nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus | -1,2213 |
| 167 | 16809506 | ARPP19 | cAMP-regulated phosphoprotein, 19kDa | -1,1773 |
| 168 | 17086634 | CKS2 | CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 | 1,2489 |
| 169 | 16772625 | POLE | polymerase (DNA directed), epsilon, catalytic subunit | -1,2252 |
| 170 | 17008867 | CUL9 | cullin 9 | 1,2387 |
| 171 | 16800108 | HAUS2 | HAUS augmin-like complex, subunit 2 | -1,1776 |
| 172 | 16829764 | GSG2 | germ cell associated 2 (haspin) | 1,1824 |
| 173 | 16912625 | MAPRE1 | microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1 | -1,1615 |
| 174 | 16676183 | ATP2B4 | ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 4 | 4,5334 |
| 175 | 16694617 | IQGAP3 | IQ motif containing GTPase activating protein 3 | 3,2017 |
| 176 | 16903090 | MCM6 | minichromosome maintenance complex component 6 | -2,0534 |
| 177 | 16959668 | CEP70 | centrosomal protein 70kDa | 1,9416 |
| 178 | 17020019 | MCM3 | minichromosome maintenance complex component 3 | -1,5997 |
| 179 | 16702547 | OPTN | optineurin | 1,5317 |
| 180 | 16702571 | MCM10 | minichromosome maintenance complex component 10 | -1,6061 |
| 181 | 17068782 | MCM4 | minichromosome maintenance complex component 4 | -1,6929 |
| 182 | 16945101 | MCM2 | minichromosome maintenance complex component 2 | -1,6040 |
| 183 | 16976158 | PPAT | phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase | -1,6920 |
| 184 | 16707551 | CEP55 | centrosomal protein 55kDa | 1,4996 |
| 185 | 16818600 | ORC6 | origin recognition complex, subunit 6 | -1,4150 |
| 186 | 17060412 | MCM7 | minichromosome maintenance complex component 7 | -1,5393 |
| 187 | 16929573 | MCM5 | minichromosome maintenance complex component 5 | -1,5156 |
| 188 | 16799598 | CASC5 | cancer susceptibility candidate 5 | 1,5386 |
| 189 | 16897797 | PNPT1 | polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1 | -1,5687 |
| 190 | 17058905 | YWHAQ | tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide | -1,3809 |
| 191 | 16911212 | MCM8 | minichromosome maintenance complex component 8 | -1,4598 |
| 192 | 16991859 | HMMR | hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM) | 1,4882 |
| 193 | 16730540 | BIRC2 | baculoviral IAP repeat containing 2 | 1,4471 |

| | | | | |
|-----|----------|------------------------------------|--|---------|
| 194 | 16850189 | <i>CSNK1D</i> | casein kinase 1, delta /// casein kinase 1, delta | 1,2736 |
| 195 | 16994170 | <i>NSUN2</i> | NOP2/Sun RNA methyltransferase family, member 2 | -1,3563 |
| 196 | 16887601 | <i>DYNC1I2</i> | dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2 /// dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2 pseudogene 1 | 1,3217 |
| 197 | 16869841 | <i>AKAP8</i> | A kinase (PRKA) anchor protein 8 | -1,3131 |
| 198 | 16913957 | <i>MYBL2</i> | v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2 | -1,2653 |
| 199 | 16903427 | <i>ORC4</i> | origin recognition complex, subunit 4 | 1,2915 |
| 200 | 17108546 | <i>BRCC3</i> | BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3 | -1,2005 |
| 201 | 17089667 | <i>ODF2</i> | outer dense fiber of sperm tails 2 | 1,2027 |
| 202 | 17066118 | <i>PCM1</i> | pericentriolar material 1 | 1,2752 |
| 203 | 17050154 | <i>PRKAR2B</i> | protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta | -1,2736 |
| 204 | 16978387 | <i>PPP3CA</i> | protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme | -1,2282 |
| 205 | 16824004 | <i>GSPT1</i> | G1 to S phase transition 1 | -1,1956 |
| 206 | 17088589 | <i>CNTRL</i> | centriolin | -1,3191 |
| 207 | 16869860 | <i>AKAP8L</i> | A kinase (PRKA) anchor protein 8-like | 1,1707 |
| 208 | 16762573 | <i>ASUN</i> | asunder spermatogenesis regulator | -1,2162 |
| 209 | 17065292 | <i>MCPH1</i> | microcephalin 1 | 1,1874 |
| 210 | 16757255 | <i>PTPN11</i> | protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 | -1,1684 |
| 211 | 16859454 | <i>BABAM1</i> | BRISC and BRCA1 A complex member 1 /// BRISC and BRCA1 A complex member 1 | 1,1937 |
| 212 | 17074571 | <i>PINX1</i> /// <i>SOX7</i> | PIN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1 /// PIN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1 /// SRY (sex determining region Y)-box 7 /// | -1,7907 |
| 213 | 17069545 | <i>RRS1</i> | RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (S. cerevisiae) | -1,8081 |
| 214 | 16851121 | <i>SEH1L</i> | SEH1-like (S. cerevisiae) | -1,6177 |
| 215 | 16736891 | <i>KIF18A</i> | kinesin family member 18A | 1,4470 |
| 216 | 16813342 | <i>PRC1</i> | protein regulator of cytokinesis 1 | 1,4497 |
| 217 | 16658664 | <i>SLC25A33</i> | solute carrier family 25 (pyrimidine nucleotide carrier), member 33 | -1,5337 |
| 218 | 16662648 | <i>CDCA8</i> | cell division cycle associated 8 | 1,3750 |
| 219 | 16877956 | <i>CENPA</i> /// <i>SLC35F6</i> | centromere protein A /// solute carrier family 35, member F6 | 1,2900 |
| 220 | 16800209 | <i>TUBGCP4</i> | tubulin, gamma complex associated protein 4 | -1,3765 |
| 221 | 16681210 | <i>KLHL21</i> | kelch-like family member 21 | -1,3355 |
| 222 | 16702503 | <i>CDC123</i> | cell division cycle 123 | -1,2633 |
| 223 | 16663958 | <i>KIF2C</i> | kinesin family member 2C | 1,3087 |
| 224 | 16725735 | <i>FEN1</i> | flap structure-specific endonuclease 1 | -1,3229 |
| 225 | 16838359 | <i>BIRC5</i> | baculoviral IAP repeat containing 5 | 1,2458 |
| 226 | 17110058 | <i>DYNLT3</i> | dynein, light chain, Tctex-type 3 | 1,3286 |
| 227 | 16779720 | <i>MZT1</i> | mitotic spindle organizing protein 1 | -1,2812 |
| 228 | 16995140 | <i>RAD1</i> | RAD1 homolog (S. pombe) | -1,2788 |
| 229 | 17098808 | <i>GOLGA2</i> | golgin A2 | 1,2481 |
| 230 | 16902411 | <i>BIN1</i> | bridging integrator 1 | 1,1726 |
| 231 | 16781136 | <i>TUBGCP3</i> | tubulin, gamma complex associated protein 3 | -1,1926 |
| 232 | 16686796 | <i>STIL</i> | SCL/TAL1 interrupting locus | 1,1698 |
| 233 | 16730522 | <i>BIRC3</i> | baculoviral IAP repeat containing 3 | 1,2017 |

| | | | | |
|-----|----------|-----------------|---|---------|
| 234 | 16869643 | <i>GIPC1</i> | GIPC PDZ domain containing family, member 1 | 2,1892 |
| 235 | 16949759 | <i>HES1</i> | hairy and enhancer of split 1, (<i>Drosophila</i>) | -2,3674 |
| 236 | 16945664 | <i>NUDT16</i> | nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 16 | 2,2200 |
| 237 | 16843376 | <i>NLE1</i> | notchless homolog 1 (<i>Drosophila</i>) | -1,4643 |
| 238 | 16957568 | <i>NAA50</i> | N(alpha)-acetyltransferase 50, NatE catalytic subunit | -1,3816 |
| 239 | 16697544 | <i>ASPM</i> | asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (<i>Drosophila</i>) | 1,5645 |
| 240 | 16658449 | <i>PHF13</i> | PHD finger protein 13 | -1,3156 |
| 241 | 16845794 | <i>KIF18B</i> | kinesin family member 18B | 1,2869 |
| 242 | 16746379 | <i>NCAPD3</i> | non-SMC condensin II complex, subunit D3 | -1,3057 |
| 243 | 17067410 | <i>FZD3</i> | frizzled family receptor 3 | -1,3675 |
| 244 | 16991839 | <i>CCNG1</i> | cyclin G1 | 1,3014 |
| 245 | 16886757 | <i>PKP4</i> | plakophilin 4 | 1,2731 |
| 246 | 16924305 | <i>BTG3</i> | BTG family, member 3 | -1,2838 |
| 247 | 16747287 | <i>NCAPD2</i> | non-SMC condensin I complex, subunit D2 | 1,2419 |
| 248 | 16984083 | <i>NIPBL</i> | Nipped-B homolog (<i>Drosophila</i>) | 1,2540 |
| 249 | 17013072 | <i>HECA</i> | headcase homolog (<i>Drosophila</i>) | 1,2521 |
| 250 | 16766137 | <i>TIMELESS</i> | timeless circadian clock | -1,1973 |
| 251 | 17080595 | <i>DSCC1</i> | DNA replication and sister chromatid cohesion 1 | -1,2818 |
| 252 | 16799357 | <i>EIF2AK4</i> | eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4 | 2,3497 |
| 253 | 16828886 | <i>GINS2</i> | GINS complex subunit 2 (Psf2 homolog) | -1,9489 |
| 254 | 16802190 | <i>MAP2K1</i> | mitogen-activated protein kinase kinase 1 | 1,7290 |
| 255 | 17072669 | <i>MYC</i> | v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) | -1,7808 |
| 256 | 16668079 | <i>GPSM2</i> | G-protein signaling modulator 2 | 1,7670 |
| 257 | 16708552 | <i>NOLC1</i> | nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 | -1,7005 |
| 258 | 16687618 | <i>DHCR24</i> | 24-dehydrocholesterol reductase | -1,5488 |
| 259 | 16721479 | <i>ILK</i> | integrin-linked kinase | 1,6867 |
| 260 | 16707695 | <i>HELLS</i> | helicase, lymphoid-specific | -1,9358 |
| 261 | 16850063 | <i>STRA13</i> | stimulated by retinoic acid 13 | -1,4507 |
| 262 | 16781285 | <i>GAS6</i> | growth arrest-specific 6 | 1,5051 |
| 263 | 16936408 | <i>MAPK12</i> | mitogen-activated protein kinase 12 | -1,4710 |
| 264 | 16958812 | <i>RUVBL1</i> | RuvB-like 1 (<i>E. coli</i>) | -1,3470 |
| 265 | 16818755 | <i>PAPD5</i> | PAP associated domain containing 5 | -1,5775 |
| 266 | 16950569 | <i>TADA3</i> | transcriptional adaptor 3 | 1,3184 |
| 267 | 17067102 | <i>CDCA2</i> | cell division cycle associated 2 | 1,3876 |
| 268 | 16987008 | <i>RASA1</i> | RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1 | 1,3267 |
| 269 | 16950146 | <i>LMLN</i> | leishmanolysin-like (metallopeptidase M8 family) | 1,4166 |
| 270 | 16880122 | <i>SPTBN1</i> | spectrin, beta, non-erythrocytic 1 | 1,4163 |
| 271 | 16685596 | <i>RRAGC</i> | Ras-related GTP binding C | 1,3558 |
| 272 | 16718983 | <i>MCMBP</i> | minichromosome maintenance complex binding protein | -1,3547 |
| 273 | 16895848 | <i>PPM1G</i> | protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1G | -1,3294 |
| 274 | 16856153 | <i>TXNL4A</i> | thioredoxin-like 4A /// thioredoxin-like 4A | -1,4108 |
| 275 | 16856463 | <i>STK11</i> | serine/threonine kinase 11 | 1,2680 |
| 276 | 16814927 | <i>TSC2</i> | tuberous sclerosis 2 /// tuberous sclerosis 2 | 1,3353 |

| | | | | |
|-----|----------|---------------------------------|---|---------|
| 277 | 16989636 | <i>KIF20A</i> | kinesin family member 20A | 1,3497 |
| 278 | 16775014 | <i>CKAP2</i> | cytoskeleton associated protein 2 | 1,2746 |
| 279 | 16671889 | <i>LAMTOR2</i> | late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 2 | 1,2901 |
| 280 | 16959465 | <i>ANAPC13</i> | anaphase promoting complex subunit 13 | -1,2918 |
| 281 | 16947904 | <i>SKIL</i> | SKI-like oncogene | 1,3348 |
| 282 | 16863243 | <i>MARK4</i> | MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4 | 1,2753 |
| 283 | 17070381 | <i>LRRCC1</i> | leucine rich repeat and coiled-coil centrosomal protein 1 | 1,3623 |
| 284 | 16847771 | <i>ERN1</i> | endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 | 1,2941 |
| 285 | 16953241 | <i>MAP4</i> | microtubule-associated protein 4 | 1,2887 |
| 286 | 16840262 | <i>NUP88</i> | nucleoporin 88kDa | -1,2444 |
| 287 | 16868838 | <i>SPC24</i> | SPC24, NDC80 kinetochore complex component | 1,2866 |
| 288 | 16760621 | <i>CDCA3</i> | cell division cycle associated 3 /// cell division cycle associated 3 | 1,2463 |
| 289 | 16673154 | <i>NUF2</i> | NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>) | 1,2743 |
| 290 | 16800991 | <i>USP8</i> | ubiquitin specific peptidase 8 | 1,2105 |
| 291 | 16697985 | <i>ARL8A</i> | ADP-ribosylation factor-like 8A | -1,2657 |
| 292 | 17099361 | <i>TSC1</i> | tuberous sclerosis 1 | 1,2335 |
| 293 | 17092852 | <i>KLHL9</i> | kelch-like family member 9 | 1,2663 |
| 294 | 16938271 | <i>KAT2B</i> | K(lysine) acetyltransferase 2B | 1,2097 |
| 295 | 16807605 | <i>OIP5</i> | Opa interacting protein 5 | 1,2784 |
| 296 | 17021596 | <i>RRAGD</i> | Ras-related GTP binding D | -1,2248 |
| 297 | 16760546 | <i>ING4</i> | inhibitor of growth family, member 4 | 1,3025 |
| 298 | 16951485 | <i>SGOL1</i> | shugoshin-like 1 (<i>S. pombe</i>) | 1,2402 |
| 299 | 16726925 | <i>SSSCA1</i> | Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1 | -1,2542 |
| 300 | 16847432 | <i>BRIP1</i> | BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1 | -1,2150 |
| 301 | 16692297 | <i>PRKAB2</i> | protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit /// 5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-2-like | 1,2324 |
| 302 | 16830839 | <i>CNTROB</i> | centrobin, centrosomal BRCA2 interacting protein | 1,1995 |
| 303 | 17057433 | <i>TBRG4</i> /// <i>SNORA5B</i> | transforming growth factor beta regulator 4 /// small nucleolar RNA, H/ACA box 5B | -1,2898 |
| 304 | 16939960 | <i>KIF15</i> | kinesin family member 15 | 1,2007 |
| 305 | 16659171 | <i>MFN2</i> | mitofusin 2 | -1,2024 |
| 306 | 16879408 | <i>EML4</i> | echinoderm microtubule associated protein like 4 | 1,2201 |
| 307 | 16673043 | <i>UHMK1</i> | U2AF homology motif (UHM) kinase 1 | -1,1728 |
| 308 | 16935142 | <i>SUN2</i> | Sad1 and UNC84 domain containing 2 | 1,2095 |
| 309 | 16911132 | <i>PRNP</i> | prion protein | -1,1875 |
| 310 | 16912192 | <i>GINS1</i> | GINS complex subunit 1 (Psf1 homolog) | -1,1576 |
| 311 | 16691668 | <i>NOTCH2</i> | notch 2 | 1,2558 |
| 312 | 16794898 | <i>NEK9</i> | NIMA-related kinase 9 | 1,2026 |
| 313 | 16661323 | <i>NUDC</i> | nuclear distribution C homolog (<i>A. nidulans</i>) | -1,1763 |
| 314 | 16851900 | <i>MAPRE2</i> | microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2 | -1,1507 |
| 315 | 16800355 | <i>WDR76</i> | WD repeat domain 76 | -1,4609 |
| 316 | 16677201 | <i>DTL</i> | denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog (<i>Drosophila</i>) | -1,5166 |
| 317 | 16773348 | <i>NUPL1</i> | nucleoporin like 1 | -1,3900 |
| 318 | 17084796 | <i>TMEM8B</i> | transmembrane protein 8B | 1,4079 |

| | | | | |
|-----|----------|----------------------|---|---------|
| 319 | 16878556 | <i>WDR43</i> | WD repeat domain 43 | -1,3830 |
| 320 | 16666835 | <i>SH3GLB1</i> | SH3-domain GRB2-like endophilin B1 | 1,3543 |
| 321 | 17101815 | <i>TXLNG</i> | taxilin gamma | -1,3422 |
| 322 | 16995409 | <i>NUP155</i> | nucleoporin 155kDa | -1,3460 |
| 323 | 17089898 | <i>NUP188</i> | nucleoporin 188kDa | -1,3945 |
| 324 | 17015889 | <i>NUP153</i> | nucleoporin 153kDa | -1,2870 |
| 325 | 17096091 | <i>PTCH1</i> | patched 1 | 1,3830 |
| 326 | 17078134 | <i>EYA1</i> | eyes absent homolog 1 (Drosophila) | 1,2446 |
| 327 | 16856699 | <i>DOT1L</i> | DOT1-like histone H3K79 methyltransferase | -1,3382 |
| 328 | 16833518 | <i>AATF</i> | apoptosis antagonizing transcription factor | -1,3220 |
| 329 | 16950932 | <i>NUP210</i> | nucleoporin 210kDa | -1,2437 |
| 330 | 16931590 | <i>PIM3</i> | pim-3 oncogene | -1,1965 |
| 331 | 17064679 | <i>XRCC2</i> | X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2 | -1,2808 |
| 332 | 16802408 | <i>FEM1B</i> | fem-1 homolog b (C. elegans) | 1,1824 |
| 333 | 16738869 | <i>PRPF19</i> | pre-mRNA processing factor 19 | -1,1841 |
| 334 | 16852098 | <i>PIK3C3</i> | phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit type 3 | 1,2416 |
| 335 | 16765284 | <i>AAAS</i> | achalasia, adrenocortical insufficiency, alacrimia | -1,1772 |
| 336 | 16702351 | <i>GATA3</i> | GATA binding protein 3 | 1,8809 |
| 337 | 16666616 | <i>PRKACB</i> | protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta | -1,6132 |
| 338 | 16909551 | <i>NPPC</i> | natriuretic peptide C | -1,7371 |
| 339 | 16973578 | <i>SLBP</i> | stem-loop binding protein | -1,3883 |
| 340 | 17008036 | <i>C6orf89</i> | chromosome 6 open reading frame 89 | 1,3555 |
| 341 | 17023414 | <i>PTPRK</i> | protein tyrosine phosphatase, receptor type, K | 1,5075 |
| 342 | 16873313 | <i>ERCC1</i> | excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence) | 1,3571 |
| 343 | 16881786 | <i>HTRA2</i> | HtrA serine peptidase 2 | -1,2968 |
| 344 | 16683624 | <i>RUNX3</i> | runt-related transcription factor 3 | -1,4499 |
| 345 | 17005396 | <i>GMNN</i> | geminin, DNA replication inhibitor | -1,3148 |
| 346 | 16734762 | <i>TRIM21</i> | tripartite motif containing 21 | 1,2879 |
| 347 | 16834071 | <i>RARA</i> | retinoic acid receptor, alpha | 1,3030 |
| 348 | 16680284 | <i>CCNL2</i> | cyclin L2 | 1,2381 |
| 349 | 16938899 | <i>MLH1</i> | mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli) | -1,1777 |
| 350 | 16925239 | <i>DONSON</i> | downstream neighbor of SON | -1,1777 |
| 351 | 17012804 | <i>MYB</i> | v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian) | -2,8656 |
| 352 | 16851427 | <i>CABLES1</i> | Cdk5 and Abl enzyme substrate 1 | -2,4560 |
| 353 | 16769144 | <i>SYCP3</i> | synaptonemal complex protein 3 | -2,4411 |
| 354 | 16841852 | <i>FLCN /// PLD6</i> | folliculin /// phospholipase D family, member 6 /// | -2,0191 |
| 355 | 16845126 | <i>STAT3</i> | signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor) | 1,8218 |
| 356 | 16693187 | <i>TDRKH</i> | tudor and KH domain containing | 1,9796 |
| 357 | 16930707 | <i>MEI1</i> | meiosis inhibitor 1 | 2,3181 |
| 358 | 16885118 | <i>RALB</i> | v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein) | 1,5882 |
| 359 | 16701748 | <i>GTPBP4</i> | GTP binding protein 4 | -1,6100 |
| 360 | 16836492 | <i>PRR11</i> | proline rich 11 | 1,5534 |
| 361 | 16669389 | <i>PHGDH</i> | phosphoglycerate dehydrogenase | -1,5170 |

| | | | | |
|-----|----------|-------------------|--|---------|
| 362 | 17080946 | KIAA0196 | KIAA0196 | 1,4631 |
| 363 | 16661567 | PHACTR4 | phosphatase and actin regulator 4 | 1,5002 |
| 364 | 16662134 | RBBP4 | retinoblastoma binding protein 4 /// retinoblastoma binding protein 4 pseudogene 1 | -1,4231 |
| 365 | 16908604 | CNPPD1 | cyclin Pas1/PHO80 domain containing 1 | 1,5461 |
| 366 | 16829369 | FANCA | Fanconi anemia, complementation group A | -1,4768 |
| 367 | 16861200 | LIN37 | lin-37 homolog (C. elegans) | 1,6304 |
| 368 | 16722217 | ARNTL | aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like | 1,4248 |
| 369 | 16662430 | AGO4 | argonaute RISC catalytic component 4 | 1,5187 |
| 370 | 17022588 | CDK19 | cyclin-dependent kinase 19 | 1,4895 |
| 371 | 16813286 | CIB1 | calcium and integrin binding 1 (calmyrin) | 1,4220 |
| 372 | 16909958 | PER2 | period circadian clock 2 | -1,4313 |
| 373 | 16694804 | ARHGEF11 | Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11 | 1,4254 |
| 374 | 16879923 | MSH6 | mutS homolog 6 (E. coli) | -1,5196 |
| 375 | 16872443 | SERTAD1 | SERTA domain containing 1 | 1,4736 |
| 376 | 16968765 | HERC5 | HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5 | -1,3810 |
| 377 | 16800173 | CCNDBP1 | cyclin D-type binding-protein 1 | 1,4003 |
| 378 | 17086784 | CENPP /// IPPK | centromere protein P /// inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase | -1,2919 |
| 379 | 17009482 | CENPQ | centromere protein Q | -1,4359 |
| 380 | 16683358 | E2F2 | E2F transcription factor 2 | -1,3198 |
| 381 | 17008595 | UBR2 | ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 2 | 1,3182 |
| 382 | 16701440 | AHCTF1 | AT hook containing transcription factor 1 /// AT hook containing transcription factor 1 pseudogene 1 | -1,3381 |
| 383 | 16982635 | TRIP13 | thyroid hormone receptor interactor 13 | -1,2976 |
| 384 | 16674998 | RNF2 | ring finger protein 2 | -1,3069 |
| 385 | 16921036 | CABLES2 | Cdk5 and Abl enzyme substrate 2 | -1,3217 |
| 386 | 16839606 | MNT | MNT, MAX dimerization protein | -1,2791 |
| 387 | 17076103 | TEX15 | testis expressed 15 | -1,4106 |
| 388 | 16842070 | TOP3A | topoisomerase (DNA) III alpha | -1,2903 |
| 389 | 16742454 | PAK1 | p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1 | 1,2194 |
| 390 | 16979400 | PRDM5 | PR domain containing 5 | 1,2678 |
| 391 | 16986748 | MSH3 | mutS homolog 3 (E. coli) | -1,1882 |
| 392 | 16985614 | CENPH | centromere protein H | -1,2111 |
| 393 | 17105401 | CENPI | centromere protein I | 1,2265 |
| 394 | 17067890 | ZNF703 | zinc finger protein 703 | 1,2442 |
| 395 | 16919044 | RBL1 | retinoblastoma-like 1 (p107) | -1,2598 |
| 396 | 16721126 | RRM1 | ribonucleotide reductase M1 | -1,2163 |
| 397 | 16935517 | CENPM | centromere protein M | -1,2661 |
| 398 | 16724516 | MADD | MAP-kinase activating death domain | 1,2190 |
| 399 | 16800117 | STARD9 | StAR-related lipid transfer (START) domain containing 9 | 1,3175 |
| 400 | 16950017 | PAK2 | p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2 | -1,1876 |
| 401 | 16768857 | CDK17 | cyclin-dependent kinase 17 | 1,1862 |
| 402 | 16933931 | PES1 | pescadillo ribosomal biogenesis factor 1 | -1,2236 |
| 403 | 16937505 | FANCD2 | Fanconi anemia, complementation group D2 | 1,1798 |
| 404 | 16669796 | TXNIP | thioredoxin interacting protein /// thioredoxin-interacting protein-like | 2,3283 |

| | | | | |
|-----|----------|----------|---|---------|
| 405 | 16801179 | MAPK6 | mitogen-activated protein kinase 6 | -1,6958 |
| 406 | 16664118 | NASP | nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) /// nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) | -1,6875 |
| 407 | 16740956 | POLD4 | polymerase (DNA-directed), delta 4, accessory subunit | 1,6832 |
| 408 | 17008092 | PIM1 | pim-1 oncogene | -1,6148 |
| 409 | 16922584 | CHAF1B | chromatin assembly factor 1, subunit B (p60) | -1,6991 |
| 410 | 16860737 | PDCD2L | programmed cell death 2-like | -1,7191 |
| 411 | 16857258 | UHRF1 | ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1 /// ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1 | -1,5932 |
| 412 | 16962493 | RFC4 | replication factor C (activator 1) 4, 37kDa | -1,3639 |
| 413 | 16713230 | PARD3 | par-3 partitioning defective 3 homolog (C. elegans) | 1,3869 |
| 414 | 16857192 | CHAF1A | chromatin assembly factor 1, subunit A (p150) | -1,4802 |
| 415 | 17058617 | RFC2 | replication factor C (activator 1) 2, 40kDa | -1,4019 |
| 416 | 17002777 | STK10 | serine/threonine kinase 10 | 1,4566 |
| 417 | 16884956 | STEAP3 | STEAP family member 3, metalloreductase | -1,4579 |
| 418 | 16856980 | HMG20B | high mobility group 20B | 1,3061 |
| 419 | 16679411 | EXO1 | exonuclease 1 | -1,3441 |
| 420 | 16794256 | ERH | enhancer of rudimentary homolog (Drosophila) | -1,3507 |
| 421 | 16985353 | ERBB2IP | erb2 interacting protein | 1,3285 |
| 422 | 17005234 | E2F3 | E2F transcription factor 3 | 1,2681 |
| 423 | 16833263 | LIG3 | ligase III, DNA, ATP-dependent /// ligase III, DNA, ATP-dependent | 1,2552 |
| 424 | 16845172 | PSMC3IP | PSMC3 interacting protein | -1,3339 |
| 425 | 17007910 | MAPK13 | mitogen-activated protein kinase 13 | 1,2889 |
| 426 | 17068093 | TACC1 | transforming, acidic coiled-coil containing protein 1 | -1,3935 |
| 427 | 16716027 | ANXA11 | annexin A11 | 1,2534 |
| 428 | 17046041 | IKZF1 | IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros) | 1,2886 |
| 429 | 17104082 | APEX2 | APEX nuclease (apurinic/aprimidinic endonuclease) 2 | -1,2737 |
| 430 | 16828153 | TXNL4B | thioredoxin-like 4B | -1,3035 |
| 431 | 16901593 | sep-01 | septin 10 | 1,3109 |
| 432 | 16969414 | TET2 | tet methylcytosine dioxygenase 2 | 1,2227 |
| 433 | 16773946 | RFC3 | replication factor C (activator 1) 3, 38kDa | -1,3430 |
| 434 | 16702685 | SUV39H2 | suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila) | -1,2245 |
| 435 | 16886503 | RIF1 | RAP1 interacting factor homolog (yeast) | -1,3189 |
| 436 | 17009918 | PTP4A1 | protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 | -1,1934 |
| 437 | 17109716 | RPS6KA3 | ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3 | -1,2300 |
| 438 | 17057174 | POLD2 | polymerase (DNA directed), delta 2, accessory subunit | -1,1924 |
| 439 | 16960517 | SIAH2 | siah E3 ubiquitin protein ligase 2 | -1,2119 |
| 440 | 16916901 | RASSF2 | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2 | -1,1804 |
| 441 | 16937035 | ARL8B / | ADP-ribosylation factor-like 8B | -1,2276 |
| 442 | 17077135 | RB1CC1 | RB1-inducible coiled-coil 1 | 1,2178 |
| 443 | 16704320 | RASSF4 | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4 | 1,1767 |
| 444 | 16757687 | RFC5 | replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa | -1,2192 |
| 445 | 17098932 | C9orf114 | chromosome 9 open reading frame 114 | -1,1867 |
| 446 | 16882304 | USP39 | ubiquitin specific peptidase 39 | -1,1906 |
| 447 | 16915173 | RBM38 | RNA binding motif protein 38 | -1,1508 |

