

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Marcadores asociados a leucemia mieloide aguda y su  
respuesta frente a fármacos**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**María Luz Morales Fernández**

**Directores**

**María Linares Gómez  
Joaquín Martínez López**

**Madrid**

**© María Luz Morales Fernández, 2022**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

MARCADORES ASOCIADOS A LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA  
Y SU RESPUESTA FRENTE A FÁRMACOS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Luz Morales Fernández

DIRECTORES

María Linares Gómez  
Joaquín Martínez López



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**TESIS DOCTORAL**

**MARCADORES ASOCIADOS A LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA Y SU  
RESPUESTA FRENTE A FÁRMACOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA**

**PRESENTADA POR**

María Luz Morales Fernández

**DIRECTORES**

María Linares Gómez

Joaquín Martínez López

**Madrid, 2021**









*Quando seamos viejos.  
Quando hayamos agotado el tiempo.  
Quando nuestras sienas estén blancas.  
Quando nos tiemblen los dedos.  
Quando andemos despacio.  
Quando nos miremos sin vernos.  
Quando recordemos con calma.  
Quando estén grandes los nietos.  
Quando llegue el invierno ...  
Estoy segura que entonces ...  
Entonces, no seremos tan viejos,  
porque nuestros corazones,  
estarán llenos y nuevos.*

***Madre y abuela,  
Encarnación Jiménez Fernández de Córdoba***



***A mi familia,  
A Miguel,***



## **AGRADECIMIENTOS**

Si estás leyendo esto, me gustaría avisarte de que, para mí, esta es sin duda la parte más difícil de escribir, y posiblemente la más importante. Esta tesis ha sido un paso en el camino inesperado, pues en mis planes no entraba un doctorado, bueno, realmente no tenía planes al terminar la carrera. Y siento que la jugada de haber echado la solicitud del máster que me ha traído hasta aquí cuando quedaba media hora para terminar el plazo ha salido demasiado bien. Me siento tan afortunada de todo lo que he aprendido que a veces dudo de si de verdad lo merezco.

No suelo tener grandes aspiraciones en la vida, sólo quiero que el camino que se presente esté plagado de diversión y aprendizaje. Y puedo decir que en estos años he gozado de ambas cosas. He tenido la suerte de estar rodeada de compañeros, que son en su mayoría amigos, y también, a pesar de la distancia que separa Madrid de mi querida Almería, de mis amigos y familiares más cercanos. He disfrutado tanto que, si existiera una máquina del tiempo, repetiría de nuevo esta experiencia sin dudarlo.

Quiero comenzar por mis directores de tesis, Joaquín y María, y es que a los dos no sólo os tengo que agradecer vuestra confianza, vuestra dedicación a la ciencia y a los “hijos científicos” que vais criando en el camino, sino también lo que a nivel personal he aprendido de cada uno de vosotros.

Quien te conozca un poco, Joaquín, sabrá que eres imparable, que estás implicado en todo lo que se tercie, y que, a pesar de ello, no has perdido la bondad, la humildad y el humor aun encontrándote en lo más alto de tu carrera, y eso es digno de admirar.

Y qué decirte a ti María, que para mí has sido guía, compañera y amiga. En estos 6 años que llevo a tu lado te he visto desde muy cerca crecer, siendo madre en la ciencia y en la vida, y puedo asegurar que ha sido increíble. Te agradezco mucho el tiempo que has dedicado a guiarme en estos pasos de mi vida siendo la mejor referente.

También quiero agradecer a Rosa el haber estado disponible para cualquier consulta y todo lo que necesitara, levantándonos el ánimo con cada resultado que hemos discutido juntas. Tú y tu falta de tapujos al hablar sois excepcionales, nunca dejes de hacerlo.

No pueden faltar aquí mis hermanas de tesis: Ale, Isa y Alba. Con cada una de vosotras he disfrutado de juegos, música, fiestas, viajes, y siempre de muchas risas. Tengo claro que, si no os hubiera conocido a cualquiera de las tres, esta historia sería completamente diferente, o al menos, más aburrida seguro. Se que la relación que hemos entablado va a durar mucho tiempo, y eso me llena más que cualquier otra cosa, de verdad.

A mis dos vecinos y amigos, Richard y Paqui, quienes han sido “un padre y una madre” un tanto peculiares, me han acompañado en la vida, y sobre todo en el camino a casa y a la Andaluza, que tanto pulpo y cerveza nos ha dado.

Blanca cuyas uñas duraban impolutas solo unas horas en el laboratorio. Rob entreteniéndome con sus historias y marcando el desayuno con su plátano de las 11:30. Noemí disponible con sonrisa incluida sea cual sea el momento. Raquel haciéndose un hueco más grande cada día.

Alicia Arenas, cariñosa y compañera. Alejandra dando vidilla a los asuntos del laboratorio y siendo esencial para todo lo que a citometría se refiera. Laura repartiendo amor del suyo por donde pasa. Natalia siempre sonriente, aunque le haya visto la cara completa meses después de conocerla. Esther y Yanira animando las quedadas de grupo, siempre acompañadas de un buen vino blanco.

El pack de cultivos Almudena-Elena-Jessi-Eva-Laura C cediéndome SU campana cada vez que lo he necesitado. Antonio dándonos charlas entre peceras. Juanma enseñándonos cosas que quizá por salud mental no deberíamos ni saber, pero nos arrancarán una carcajada cada vez que las recordemos. Mari Pili pringando todo con sus aceites. El team de Biobanco, Vane, Alicia, Lauras y la ex Xandra, siempre preparadas para ayudar, hablar o reír, gracias.

Los compañeros del CNIO, disponibles para todo, ya sea ciencia u ocio, os necesitamos más cerca. A todos los compañeros de asistencial, Inma, Gonzalo, Paloma, Merche, Marijose, Inés, Blanca y Reyes, muchas gracias por prestarme los equipos en vuestros tiempos de reserva ∞, y por alegrarme los días, que ha sido mejor aún.

Seguramente olvide a alguien en estas líneas, pero sabed que los demás compañeros, los que se fueron, continúan y comienzan, todos habéis sido esenciales.

También quiero mencionar a las sorpresas de este viaje, José Carlos, con cerveza artesana en mano, Javi, omnipresente en cultivos y Diego en las charlas de LMA. Gracias por todos los buenos ratos que me habéis dado.

Gracias también a Armando por habernos apoyado en la bioinformática de esta tesis.

Y no puede faltar tampoco el agradecimiento a la Fundación CRIS contra el cáncer, a la Fundación Española de Hematología y Hemoterapia y al Instituto de Salud Carlos III por su apoyo económico durante la realización de este trabajo.

A mis amigos más cercanos, los que conozco desde el colegio y los que he ido encontrando durante mis años académicos, Rocío, Belén, Sheila, Majo, Enano, Perecito, Ainhoa, Fran, Desirée, Azamaza y Rosa, sois únicos, aunque solo sea porque soportáis mi humor sarcástico y no huis, os quiero.

A mis padres, hermanos y abuelos, biológicos y adoptivos, muchas gracias por haberme cuidado tanto siempre, y en especial, en estos últimos meses. Mamá y papá, solo deseo ser la mitad de buenos padres que habéis sido vosotros. Gracias por vuestro esfuerzo en ayudarme en cada paso que he dado, aunque no entendáis lo que hago, porque ciertamente, a veces no lo entiendo ni yo. Nena y Bob, aunque nuestras vidas nos hayan llevado por caminos lejanos os quiero igual.

A Miguelon, por tu impaciencia, inquietud y resolución, que cada vez admiro más, y desde luego, por todo el amor que me has dado sin pedir nada a cambio, gracias por estar siempre. ¡Ah! Y gracias por comprar una tele de 50 pulgadas y luego no llevártela, me ha hecho bastante compañía.

Por último, quiero dedicar este trabajo a todos aquellos a quienes, por desgracia, hemos despedido en estos años acompañados por la temible palabra “cáncer”, abuelita Rosa, Ma(má)Noli, Lola y Laura.

Y por supuesto, a todos los pacientes y a los familiares de quienes padecen cáncer, cuya lucha define sin duda el sentido más real de nuestro trabajo.

Gracias.







# ÍNDICE



## **LISTADO DE CONTENIDOS**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
1.1. DEFINICIÓN.....	15
1.1.1. Sintomatología.....	16
1.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	18
1.2.1. Incidencia .....	18
1.2.2. Mortalidad.....	19
1.3. CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD .....	20
1.3.1. Clasificación de la FAB.....	20
1.3.2. Clasificación de la OMS .....	21
1.3.3. Clasificación de la ELN.....	22
1.4. BASES MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD .....	23
1.4.1. Alteraciones en el mecanismo de corte y empalme del ARN mensajero .....	24
1.4.1.1. Maquinaria de corte y empalme del ARN mensajero.....	24
1.4.1.2. Funcionalidad normal .....	26
1.4.1.3. Funcionalidad alterada .....	27
1.4.2. Alteraciones en vías de señalización .....	29
1.4.2.1. FLT3 .....	29
1.4.2.2. KIT .....	31
1.4.2.3. NRAS.....	31
1.4.3. Alteraciones en la metilación del ADN .....	31
1.4.4. Alteraciones en mecanismos protectores .....	31
1.5. EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA LMA.....	32
1.6. TRATAMIENTOS .....	33
1.6.1. Esquemas de quimioterapia .....	34
1.6.2. Terapias de baja intensidad .....	35
1.6.3. Fármacos diana - específicos .....	35
1.6.3.1. Inhibidores del mecanismo de corte y empalme del ARN mensajero .....	35
1.6.3.2. Inhibidores de FLT3.....	36
1.6.3.2.1. Midostaurina.....	38
1.6.3.2.2. Gilteritinib.....	38
1.6.3.2.3. Otros inhibidores de FLT3.....	39
1.6.3.3. Otros inhibidores diana – específicos .....	40
1.6.3.3.1. Inhibidores de la vía RAS/MEK1/2.....	40
1.6.3.3.2. Inhibidores de IDH1/2.....	40
1.6.3.3.3. Inhibición de mecanismos protectores.....	40
1.6.4. Combinaciones farmacológicas .....	41

1.7.	RESISTENCIAS FARMACOLÓGICAS .....	42
1.7.1.	Mecanismos de resistencia farmacológica.....	42
1.7.1.1.	Mecanismos de resistencia farmacológica a citarabina.....	44
1.7.1.2.	Mecanismos de resistencia farmacológica a inhibidores tirosina quinasa..	47
1.8.	MEDICINA PERSONALIZADA: LA PERSPECTIVA FUTURA DE LA LMA .....	51
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	53
2.1.	HIPÓTESIS .....	55
2.2.	OBJETIVOS .....	56
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	57
3.1.	SELECCIÓN DE MUESTRAS DE PACIENTES Y DONANTES SANOS.....	59
3.1.1.	Muestras de ácidos nucleicos .....	60
3.1.2.	Muestras de proteínas.....	61
3.1.3.	Células primarias.....	62
3.2.	FÁRMACOS .....	62
3.3.	CULTIVOS CELULARES Y GENERACIÓN DE MODELOS DE RESISTENCIA.....	63
3.4.	TÉCNICAS PARA LA EXTRACCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	64
3.4.1.	Técnicas de extracción de ácidos nucleicos .....	64
3.4.2.	Técnicas de extracción de proteínas.....	65
3.5.	TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN.....	66
3.5.1.	Técnicas de cuantificación de ácidos nucleicos.....	66
3.5.2.	Técnicas de cuantificación de proteínas .....	66
3.6.	DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS MUESTRAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	66
3.7.	TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	67
3.7.1.	Expresión de ARN en bases de datos públicas .....	67
3.7.2.	Generación de ADN copia mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).....	67
3.7.3.	Expresión de ARN por PCR cuantitativa (PCRq).....	68
3.7.4.	Secuenciación de ADN.....	68
3.7.4.1.	Procedimiento.....	69
3.7.4.2.	Análisis de secuenciación de ADN.....	71
3.7.5.	Secuenciación de ARN.....	71
3.7.5.1.	Procedimiento.....	71
3.7.5.2.	Análisis de secuenciación de ARN.....	75
3.8.	TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....	75
3.8.1.	Estudios de fosfo-proteómica .....	75
3.8.1.1.	Procedimiento.....	75
3.8.1.2.	Análisis de estudios de fosfo-proteómica.....	76
3.8.2.	Histopatología e inmunohistoquímica .....	77
3.8.3.	Electrotransferencia.....	80

3.9.	ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS.....	82
3.9.1.	Separación celular de células resistentes a 48 horas.....	82
3.9.2.	Pre-tratamiento para los estudios de fosforilación.....	83
3.9.3.	Experimentos de dosis-respuesta a fármacos: tratamientos en monoterapia y en combinación.....	84
3.9.4.	Estudios de toxicidad farmacológica.....	87
3.9.5.	Estudios <i>in vivo</i> .....	88
3.10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	89
4.	RESULTADOS.....	91
4.1.	ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA FARMACOLÓGICA A ESQUEMAS DE TRATAMIENTO CON CITARABINA.....	93
4.1.1.	Estudio del papel de las proteínas sr en patología mieloide y su relación con la respuesta al tratamiento con citarabina.....	93
4.1.1.1.	La presencia de alteraciones en la expresión de genes codificantes de proteínas SR fue detectada en patología mieloide pero no se asociaba a la respuesta al tratamiento con citarabina.....	93
4.1.1.2.	Las variaciones en la fosforilación de las proteínas SR se relacionaban con la respuesta farmacológica a citarabina.....	96
4.1.1.3.	Las variaciones observadas en los niveles de fosforilación de las proteínas SR en pacientes de LMA resistentes a citarabina se vincularon con alteraciones en el mecanismo de corte y empalme del ARN mensajero.....	105
4.1.2.	Evaluación de la inhibición del proceso de corte y empalme del arn mensajero en monoterapia y en combinación en modelos <i>in vitro</i> de la enfermedad.....	108
4.1.2.1.	El tratamiento farmacológico con inhibidores de corte y empalme del ARN mensajero presentó actividad antitumoral en modelos celulares de leucemia mieloide aguda.....	108
4.1.2.2.	Los inhibidores del espliceosoma fueron efectivos en modelos <i>in vitro</i> de resistencia a citarabina de la enfermedad.....	109
4.1.2.3.	La combinación de un inhibidor de splicing junto a otras terapias clínicas aprobadas podría ser una buena opción terapéutica para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda.....	112
4.1.3.	Evaluación de la eficacia y seguridad de la combinación del inhibidor de <i>splicing</i> , h3b-8800, y el inhibidor de bcl-2, venetoclax, en modelos <i>ex vivo</i> de la enfermedad.....	115
4.1.3.1.	La evaluación <i>ex vivo</i> del inhibidor de <i>splicing</i> H3B-8800 junto a venetoclax mostró efectos sinérgicos en muestras de pacientes de LMA.....	115
4.1.3.2.	La combinación del inhibidor de <i>splicing</i> H3B-880 con venetoclax mantuvo la seguridad frente a progenitores mieloides de donantes sanos.....	117
4.2.	ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA FARMACOLÓGICA A INHIBIDORES TIROSINA QUINASA.....	119
4.2.1.	Estudio de la resistencia farmacológica a los inhibidores de FLT3.....	119
4.2.1.1.	Tres de cada cinco pacientes de LMA con mutaciones en <i>FLT3</i> perdieron la respuesta al tratamiento con TKI a los pocos meses de haber iniciado el tratamiento.....	119
4.2.1.2.	La ruta ERK1/2 estaba sobre-activada en los pacientes de LMA con <i>FLT3</i> mutado tratados con inhibidores tirosina quinasa.....	120
4.2.1.3.	La vía ERK1/2 presentó mayor activación tras el desarrollo de resistencia a TKI <i>in vitro</i> .....	123

4.2.2.	Evaluación de la inhibición de la vía de resistencia ERK1/2 en monoterapia y en combinación en modelos <i>in vitro</i> de la enfermedad con <i>FLT3</i> mutado o salvaje .....	126
4.2.2.1.	Trametinib fue efectivo y mostró efectos sinérgicos con inhibidores tirosina quinasa en las células sensibles con <i>FLT3</i> mutado, MOLM-13, y resistentes a TKI, MOLM-13_R20nMS.....	126
4.2.2.2.	La combinación de midostaurina con trametinib mostró la mayor efectividad <i>in vitro</i> en la inhibición de las vías subyacentes a <i>FLT3</i> .....	128
4.2.2.3.	La combinación de midostaurina y trametinib presentó sinergia <i>in vitro</i> en el contexto de LMA <i>wildtype</i> para <i>FLT3</i> .....	132
4.2.3.	Evaluación de la eficacia y seguridad de la combinación del inhibidor de <i>FLT3</i> , midostaurina, con el inhibidor de la vía de resistencia ERK1/2, trametinib, en modelos <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> de la enfermedad.....	137
4.2.3.1.	Midostaurina y trametinib fueron efectivos en LMA <i>wildtype</i> para <i>FLT3</i> y presentaron sinergia fuerte <i>ex vivo</i> en las muestras de pacientes de LMA.....	137
4.2.3.2.	La combinación de midostaurina y trametinib demostró ser segura <i>ex vivo</i> en células CD34+ de donantes sanos .....	140
4.2.3.3.	La combinación de midostaurina con trametinib mejoró significativamente la supervivencia global respecto a la monoterapia en un modelo <i>in vivo</i> de leucemia mieloide aguda.....	141
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>147</b>
5.1.	<b>MECANISMOS DE RESISTENCIA A CITARABINA.....</b>	<b>149</b>
5.1.1.	Caracterización genética de las proteínas SR en el desarrollo de la LMA y la resistencia a citarabina.....	149
5.1.2.	Caracterización proteica de las proteínas SR en LMA y la respuesta al tratamiento con citarabina. ....	151
5.1.3.	Caracterización funcional del mecanismo de corte y empalme del ARN mensajero en relación con la respuesta a citarabina.....	153
5.1.4.	Evaluación de inhibidores del mecanismo de corte y empalme del ARN mensajero en monoterapia o en combinación en modelos <i>in vitro</i> de LMA. ....	154
5.1.5.	Estudio de la efectividad y seguridad de la inhibición del <i>splicing</i> en combinación con la inhibición de Bcl-2 en muestras <i>ex vivo</i> de LMA. ....	157
5.2.	<b>MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS INHIBIDORES TIROSINA QUINASA ...</b>	<b>159</b>
5.2.1.	Caracterización de los mecanismos de resistencia farmacológica a los inhibidores de <i>FLT3</i> .....	159
5.2.2.	Estudio de la efectividad de la inhibición de la vía ERK1/2 en monoterapia o en combinación en modelos <i>in vitro</i> de LMA con <i>FLT3</i> mutado. ....	162
5.2.3.	Evaluación de la inhibición de la vía ERK1/2 en monoterapia o en combinación con los <i>FLT3i</i> en modelos <i>in vitro</i> de LMA sin mutaciones en <i>FLT3</i> . ....	164
5.2.4.	Estudio de la efectividad y seguridad de la inhibición concomitante de la vía ERK1/2 y <i>FLT3</i> en muestras <i>ex vivo</i> de LMA. ....	166
5.2.5.	Evaluación de la combinación de trametinib con midostaurina en un modelo murino <i>in vivo</i> de LMA.....	168
5.3.	<b>TRASLACIÓN CLÍNICA DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>171</b>
5.3.1.	Estratificación pronóstica de la enfermedad. ....	171
5.3.2.	Empleabilidad de los tratamientos en combinación. ....	173
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>177</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>181</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>201</b>

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Proceso normal de diferenciación mieloide. ....	15
Figura 2. Poblaciones hematológicas en un contexto sano y patológico. ....	16
Figura 3. Proceso normal de hematopoyesis.....	17
Figura 4. Incidencia de LMA en los Estados Unidos (EE. UU.) por edad y género, periodo 2011 – 2016.....	18
Figura 5. Porcentaje de supervivencia global a 5 años de LMA en los EE. UU. por edad, periodo 2011 – 2016.....	19
Figura 6. Clasificación de las mutaciones presentes de manera recurrente en LMA por categorías funcionales. ....	23
Figura 7. Maquinaria de corte y empalme del ARN mensajero. ....	25
Figura 8. Funciones de las proteínas SR.....	26
Figura 9. Dominios componentes del receptor FLT3. ....	29
Figura 10. Mapas de las quinasas dianas de los inhibidores tirosina quinasa. ....	37
Figura 11. Mecanismos moleculares más comunes de resistencia a citarabina. ....	46
Figura 12. Mecanismos moleculares más comunes de resistencia a los TKI. ....	50
Figura 13. Esquema de aislamiento de distintos clones de OCI-AML3_R20μMC, modelos de resistencia a citarabina.....	63
Figura 14. Esquema de flujo de trabajo para la secuenciación del ADN.....	69
Figura 15. Esquema de flujo de trabajo para la secuenciación del ARN.....	73
Figura 16. Esquema de flujo de trabajo para los estudios de fosfo-proteómica.....	76
Figura 17. Protocolo de inmunohistoquímica.....	78
Figura 18. Estrategia de trabajo para la separación de células proliferativas viables. ....	83
Figura 19. Protocolo de experimentos de dosis – respuesta a fármacos. ....	85
Figura 20. Esquema de estudios <i>in vivo</i> . ....	88
Figura 21. Los niveles de expresión de <i>SRRM2</i> , <i>SRSF12</i> y <i>SRSF9</i> se mostraron alterados en LMA (en color azul) respecto a muestras control (en color gris). ....	93
Figura 22. Los niveles de expresión génica de <i>SRRM2</i> y <i>SRSF12</i> se mostraron aumentados en LMA y otras enfermedades mieloides respecto a muestras control. ....	94
Figura 23. La expresión de genes codificantes de proteínas SR no mostró diferencias entre pacientes con LMA respondedores o no al tratamiento con citarabina. ....	95
Figura 24. La expresión génica de <i>SRRM2</i> se mantuvo en siete pacientes con LMA tras recibir esquemas de tratamiento con citarabina y desarrollar resistencia.....	96
Figura 25. La comparativa pareada de los perfiles fosfo-proteómicos de tres pacientes con LMA mostró alteraciones en la fosforilación de <i>SRRM2</i> y otras proteínas SR. ....	97
Figura 26. Los niveles de fosforilación de <i>SRRM2</i> estaban aumentados durante la resistencia a citarabina en tres pacientes con LMA respecto a sus diagnósticos. ....	98
Figura 27. La fosforilación de las proteínas SR estaba aumentada en pacientes que presentaron una recaída en la enfermedad tras el tratamiento con citarabina.....	99

Figura 28. La fosforilación de las proteínas SR no estaba aumentada en pacientes que mostraron refractariedad al tratamiento con citarabina. ....	101
Figura 29. Los niveles de proteínas SR en su forma fosforilada fueron mayores al diagnóstico de pacientes que no respondieron al tratamiento con citarabina. ....	103
Figura 30. El perfil mutacional de los pacientes respondedores (n = 38) y no respondedores (n = 16) al tratamiento con citarabina no se vio modificado. ....	104
Figura 31. Algunas dianas de proteínas SR presentan alteraciones en el corte y empalme del ARN mensajero. ....	107
Figura 32. La citarabina mostró efectividad en el rango micromolar en las tres líneas celulares modelo de LMA empleadas. ....	108
Figura 33. H3B-8800 mostró la mayor eficacia en las líneas celulares testadas. ....	109
Figura 34. La línea resistente a citarabina generada, OCI-AML3_R20 $\mu$ MC, mostró una IC50 aproximadamente 4000 veces mayor que la de su línea parental OCI-AML3. ....	110
Figura 35. Esquema de selección de clones individuales aislados a partir del modelo de resistencia OCI-AML3_R20 $\mu$ MC mediante inmunohistoquímica. ....	110
Figura 36. Seis de los 20 clones resistentes aislados mostraron mayor fosforilación de las proteínas SR respecto a la línea parental. ....	111
Figura 37. Los clones resistentes a citarabina 1, 2 y 16 mostraron valores de IC50 superiores a los observados en la línea parental OCI-AML3. ....	111
Figura 38. Los clones resistentes 1, 2 y 16 mostraron valores de IC50 para los inhibidores de splicing similares a los observados en la línea parental OCI-AML3. ....	112
Figura 39. Todos los fármacos ensayados mostraron efectividades similares en las líneas sensible y resistente a citarabina. ....	113
Figura 40. La combinación de H3B-8800 con venetoclax mostró la mayor potencia citotóxica. ....	114
Figura 41. La combinación de H3B-8800 con venetoclax mostró efectos de sinergia fuerte <i>ex vivo</i> en muestras de tres pacientes de LMA. ....	116
Figura 42. La combinación de H3B-8800 (H) con venetoclax (V) mostró su seguridad en progenitores mieloides CD34+ de tres donantes sanos. ....	117
Figura 43. La proteína ERK1/2 presentaba sobre-activación tras el tratamiento continuado con TKI en pacientes de LMA que presentaban mutaciones en <i>FLT3</i> . ....	121
Figura 44. La proteína ERK1/2 estaba sobre-activada tras el tratamiento continuado con TKI en pacientes de LMA con <i>FLT3</i> mutado. ....	122
Figura 45. Generación de una línea resistente a TKI <i>in vitro</i> . ....	123
Figura 46. La relación de fosfo-ERK1/2 / ERK1/2 medida por electrotransferencia se mostró elevada en MOLM-13_R20nMS respecto a MOLM-13. ....	124
Figura 47. Gráficas representativas del flujo de trabajo para la separación celular. ....	125
Figura 48. La vía ERK1/2 se encontraba sobre-activada tras la exposición sostenida a TKI <i>in vitro</i> . ....	126

Figura 49. Trametinib inhibió eficazmente el crecimiento celular de las células MOLM-13 y MOLM-13_R20nMS y mostró sinergia con TKI. ....	128
Figura 50. Los niveles de ERK1/2, STAT5, AKT y de sus formas fosforiladas fueron analizados por electrotransferencia en el cultivo sensible a TKI, MOLM-13, tras el tratamiento en monoterapia o combinado con sorafenib, midostaurina o trametinib. ....	129
Figura 51. Los niveles de ERK1/2, STAT5, AKT y de sus formas fosforiladas se analizaron por electrotransferencia en el cultivo resistente, MOLM-13_R20nMS, tras el tratamiento en monoterapia o combinado con sorafenib, midostaurina o trametinib. ....	131
Figura 52. La sinergia de midostaurina con trametinib se mantuvo en la línea resistente a TKI, MOLM-13_R20nMS. ....	132
Figura 53. Los niveles de fosfo-ERK1/2 también se vieron aumentados en el contexto de la resistencia a TKI en el fondo genético <i>wildtype</i> para <i>FLT3</i> . ....	133
Figura 54. Los inhibidores tirosina quinasa, midostaurina y sorafenib, y el inhibidor de MEK1/2, trametinib, mantuvieron la eficacia en un contexto genético <i>FLT3 wildtype</i> . ....	134
Figura 55. La combinación de sorafenib o midostaurina con trametinib mostró sinergia fuerte en modelos <i>in vitro</i> de LMA con <i>FLT3 wildtype</i> . ....	135
Figura 56. La combinación de midostaurina y trametinib demostró ser beneficiosa en el contexto de resistencia a TKI con <i>FLT3 wildtype</i> . ....	136
Figura 57. Midostaurina y trametinib mantuvieron la eficacia farmacológica <i>ex vivo</i> en muestras de células primarias de LMA. ....	138
Figura 58. La combinación de midostaurina con trametinib muestra efectos de sinergia fuerte en muestras de LMA <i>ex vivo</i> . ....	139
Figura 59. La combinación de midostaurina y trametinib demostró ser segura en células de donantes sanos. ....	140
Figura 60. La combinación de midostaurina y trametinib mejoró la supervivencia significativamente en comparación a los tratamientos en monoterapia <i>in vivo</i> . ....	142
Figura 61. Cortes histológicos de médula ósea de los modelos de LMA <i>in vivo</i> teñidos con hematoxilina-eosina y anticuerpo anti-CD45 humano a aumentos 4X y 40X. ....	143
Figura 62. Cortes histológicos de bazo, hígado y vejiga urinaria teñidos con hematoxilina-eosina mostrando secciones tumorales o no tumorales en cada caso. ....	144

## **LISTADO DE TABLAS**

Tabla 1. Clasificación de la FAB. ....	20
Tabla 2. Clasificación de la OMS. ....	21
Tabla 3. Clasificación de la ELN. ....	22
Tabla 4. Datos demográficos de los grupos de pacientes con LMA, NMP y SMD seleccionados y donantes sanos cuyas muestras han sido empleadas. ....	59
Tabla 5. Componentes del tampón de lisis frío. ....	65
Tabla 6. Descripción de programas empleados para los experimentos de secuenciación de ADN. ....	70
Tabla 7. Descripción de programas empleados para los experimentos de secuenciación de ARN. ....	74
Tabla 8. Listado de anticuerpos primarios y secundarios empleados para los estudios de histopatología e inmunohistoquímica. ....	79
Tabla 9. Listado de anticuerpos primarios y secundarios empleados para los estudios de electrotransferencia. ....	81
Tabla 10. Descripción de dosis farmacológicas empleadas para los experimentos <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> de dosis-respuesta en monoterapia y en combinación. ....	86
Tabla 11. Descripción de dosis farmacológicas empleadas para los experimentos <i>ex vivo</i> de toxicidad en monoterapia y en combinación. ....	87

## **LISTADO DE ANEXOS**

Anexo 1. Listado de ensayos clínicos mencionados en el texto. ....	203
Anexo 2. Listado de pacientes con LMA, NMP, SMD y donantes sanos. ....	207
Anexo 3. Listado de genes codificantes de proteínas SR. ....	213
Anexo 4. Listado de genes contemplados en el panel mieloide de secuenciación por NGS. ...	214
Anexo 5. Imágenes de los estudios inmunohistoquímicos de las proteínas SR fosforiladas. ...	215
Anexo 6. Publicaciones derivadas de esta tesis. ....	218

## ABREVIATURAS

**ADNc:** ADN copia

**ARNm:** ARN mensajero

**ARNr:** ARN ribosómico

**BMMC:** células mononucleadas de médula ósea

**BSA:** albúmina de suero bovino

**CDA:** citidina desaminasa

**CFDA-SE:** 5-(y-6)-carboxifluoresceína succinimidil éster

**CI:** índice de combinación

**CNIO:** Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

**Ct:** umbral del ciclo, del inglés *cycle threshold*

**DCK:** desoxicitidina quinasa

**DEU:** uso diferencial de exones, del inglés *differential exons usage*

**DG:** diagnóstico

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**dNTPs:** desoxinucleótidos trifosfato

**ECD:** dominio extracelular

**EE. UU.:** Estados Unidos

**ELN:** grupo europeo para la leucemia o *European Leukemia Net*

**ENT1:** transportador de nucleósidos equilibrador

**F:** femenino

**FAB:** grupo cooperativo Franco-Americano-Británico

**FBS:** suero bovino fetal

**FC:** *fold change*

**FDA:** *U.S. Food and Drug Administration*

**FGF2:** factor de crecimiento de fibroblastos

**FLT3:** *FMS-like tyrosine kinase 3*

**FLT3i:** inhibidor de FLT3

**FLT3-L:** ligando de FLT3

**FLT3-Lh:** ligando humano de FLT3

**FOXM1:** proteína M1 de la caja *Forkhead*

**G:** género

**GEPIA:** *gene expression profiling interactive analysis*

**GSEA:** *Gene set enrichment analysis*

**GTEX:** *Genotype-Tissue expression*

**H&E:** hematoxilina y eosina

**hnRNPs:** ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares, del inglés *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*

**HR:** tasa de riesgos instantáneos o *hazard ratio*

**HSC:** células madre hematopoyéticas

**IC:** intervalo de confianza

**IC50:** concentración inhibitoria media máxima

**IDH:** isocitrato deshidrogenasa

**IL3h:** interleuquina 3 humana

**IL6h:** interleuquina 6 humana

**IMAC:** cromatografía de afinidad con metales inmovilizados

**ITD:** duplicaciones internas en tándem

**JAK:** *Janus kinase*

**JMD:** dominio yuxtamembrana

**LC-MS/MS:** cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

**LMA:** leucemia mieloide aguda

**LMA-s:** LMA secundaria a enfermedades mielodisplásicas

**LMA-t:** LMA secundaria relacionada con la terapia

**LMC:** leucemia mielomonocítica crónica

**LncRNA:** ARN no codificante de cadena larga

**LPA:** leucemia promielocítica aguda

**LSC:** células madre leucémicas

**Lys-C:** *Lysyl endopeptidase*

**M:** masculino

**MAF:** frecuencia alélica mínima

**MAPK:** *mitogen – activated Protein kinase*

**MDR:** transportadores de resistencia multifármaco

**MET:** metanol

**MO:** médula ósea

**MPO:** mieloperoxidasa

**NMP:** neoplasia mieloproliferativa

**NR:** no respondedor

**NSG:** *nod scid gamma*

**NXF1:** factor 1 de exportación nuclear

**OMS:** organización mundial de la salud

**P:** parafina

**PA:** poliacrilamida

**PBMC:** células mononucleadas de sangre periférica

**PBS:** tampón fosfato salino

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PCRq:** PCR cuantitativa

**PI3K:** *phosphatidylinositol kinase*

**PVDF:** polifluoruro de vinilideno

**R/R:** refractariedad o recaída

**R:** respondedor

**RC:** remisión completa

**REC:** recaída

**REF:** refractariedad

**RNA-seq:** secuenciación de ARN

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**RRM:** *RNA recognition motif*

**RT-PCR:** PCR con transcriptasa reversa

**SCFh:** factor *stem cell* humano

**SCFR:** *stem cell factor receptor*

**SDS:** dodecilsulfato sódico

**SEM:** error estándar de la media

**SMD:** síndrome mielodisplásico

**snRNP:** *small nuclear ribonucleoprotein*

**SP:** sangre periférica

**SR:** serina / arginina

**STAT5:** *signal transducer and activator of transcription 5*

**TBS:** tampón Tris salino

**TCGA:** *The Cancer Genome Atlas*

**TKD:** dominio tirosina quinasa

**TKI:** inhibidor tirosina quinasa

**TMD:** dominio transmembrana

**Tw:** Tween® 20

**UFC-E:** unidad formadora de colonias eritroides

**UFC-GM:** unidad formadora de colonias granulocíticas – monocíticas

**UNESCO:** Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura

**VEGF-C:** factor C de crecimiento endotelial vascular

**WES:** secuenciación de exoma completo

**WT:** *wildtype*

# RESUMEN



## **Introducción**

La leucemia mieloide aguda es un cáncer sanguíneo altamente heterogéneo que se caracteriza por la expansión descontrolada de células progenitoras mieloides del sistema hematopoyético. Supone la leucemia más común en adultos y la segunda más frecuente en niños. Su incidencia y mortalidad incrementan conforme aumenta la edad de los pacientes. Por esta razón, es una enfermedad que afecta habitualmente a la población de edad superior a 65 años, quienes presentan un porcentaje de supervivencia a 5 años inferior al 13,5 %.

A pesar del avance en el conocimiento molecular de la patología, el tratamiento de los pacientes no ha variado sustancialmente en las últimas décadas. Aunque recientemente se han aprobado varios fármacos como terapia para la LMA, todos ellos distan de ser totalmente efectivos. En consecuencia, las respuestas que se alcanzan tras la administración de los compuestos disponibles son cortas, siendo común la aparición de resistencias farmacológicas. Por ende, la falta de efectividad de las distintas opciones terapéuticas es la principal responsable de la mortalidad asociada a la enfermedad.

En este aspecto, el estudio de los mecanismos de resistencia farmacológica en LMA puede resultar muy útil para identificar biomarcadores de respuesta a los tratamientos disponibles, y para evaluar nuevas estrategias terapéuticas que permitan prevenir la aparición de resistencias, o superarlas si se presentan.

## **Objetivos**

El objetivo principal de esta tesis ha sido dilucidar los mecanismos moleculares responsables de la resistencia a los esquemas de quimioterapia con citarabina y a los inhibidores tirosina quinasa. Por consiguiente, se han propuesto nuevos biomarcadores de respuesta farmacológica, así como distintas alternativas de tratamiento que se espera permitan alcanzar mayores beneficios a nivel clínico.

## **Materiales y métodos**

Para desempeñar los objetivos propuestos en esta tesis se han empleado datos públicamente disponibles, así como muestras de pacientes con LMA u otras enfermedades mieloides (NMP y SMD), muestras de donantes sanos, y distintas líneas celulares humanas. Adicionalmente, se han generado modelos celulares farmacológicamente resistentes que mimetizan las características encontradas en los

pacientes con LMA. Con estos materiales, se han llevado a cabo técnicas de análisis de ácidos nucleicos, como los estudios de expresión génica por PCR cuantitativa, además de estudios de secuenciación de ADN y ARN. Asimismo, se han empleado técnicas de análisis de proteínas como los estudios de fosfo-proteómica o las técnicas de histopatología, inmunohistoquímica y electrotransferencia. Por último, se han llevado a cabo varios experimentos para evaluar la respuesta farmacológica, como experimentos en modelos *in vitro* y *ex vivo* de dosis-respuesta a fármacos en monoterapia o en combinación, estudios de toxicidad farmacológica en cultivos primarios, y finalmente, se ha examinado la eficacia y seguridad de las terapias seleccionadas en un modelo *in vivo* de la enfermedad.

## Resultados

Por un lado, el estudio de los mecanismos de resistencia farmacológica a los esquemas de tratamiento con citarabina ha permitido la identificación de alteraciones en la fosforilación de ciertos componentes de la maquinaria de corte y empalme del ARN mensajero. En base a los resultados presentados en este trabajo se ha relacionado la presencia de mayores niveles de fosforilación de las proteínas SR al diagnóstico, con falta de respuesta al compuesto citarabina. Además, dichas alteraciones se han vinculado a fallos en la funcionalidad del espliceosoma. La evaluación de distintas opciones terapéuticas ha demostrado la utilidad de la combinación del inhibidor del *splicing*, H3B-8800, con el inhibidor de Bcl-2, venetoclax, como una estrategia terapéutica efectiva para el tratamiento de la LMA sensible o resistente a citarabina. La combinación de ambos fármacos ha mostrado ser efectiva y segura *ex vivo*, por lo que se propone como un tratamiento prometedor para la LMA.

Por otro lado, el estudio de los mecanismos de resistencia farmacológica a los inhibidores tirosina quinasa ha evidenciado la activación de la vía de supervivencia ERK1/2 como un mecanismo de evasión al tratamiento con TKIs. Esta activación se ha detectado en muestras *ex vivo* de pacientes con LMA y se ha validado en distintos modelos de resistencia *in vitro*. La inhibición concomitante del receptor FLT3 y la ruta de señalización ERK1/2 ha mostrado ser efectiva para el tratamiento de la LMA independientemente del estado mutacional de *FLT3*. En particular, la combinación de midostaurina con trametinib ha probado ser eficaz en el modelo *in vitro* resistente a TKI, ayudando a prevenir el desarrollo de resistencias farmacológicas, además de generar una inhibición efectiva y segura en muestras *ex vivo*. Adicionalmente, la combinación ha mejorado la supervivencia en modelos murinos de LMA, pudiendo controlar la

progresión de la enfermedad durante un periodo de tiempo más prolongado en comparación a los grupos de tratamiento con monoterapia. Por todo ello, se propone el uso combinado de ambos fármacos como una estrategia plausible para el tratamiento de pacientes con LMA que porten o no mutaciones en *FLT3*.

### **Conclusiones**

En definitiva, los resultados presentados en este trabajo muestran la implicación de alteraciones post-traduccionales en ciertos componentes del espliceosoma durante la resistencia farmacológica a citarabina. En concreto, se propone la cuantificación de los niveles de fosforilación de las proteínas SR como un biomarcador predictivo de la respuesta al compuesto que permita discernir entre aquellos pacientes que se beneficien o no de su empleo. Asimismo, se propone el uso combinado de H3B-8800 con venetoclax como una opción terapéutica para el tratamiento de pacientes con LMA *de novo* o en refractariedad / recaída tras haber recibido citarabina.

Adicionalmente, se ha evidenciado la activación de la vía de supervivencia ERK1/2 como un mecanismo factible de resistencia farmacológica a los inhibidores tirosina quinasa, tanto en modelos de expresión salvaje o mutada del gen *FLT3*, que puede emplearse como biomarcador de respuesta a los TKI. La inhibición concomitante del receptor FLT3 y la vía de resistencia ERK1/2 se postula como una estrategia terapéutica interesante para el tratamiento de los enfermos de LMA, que permite, además, prevenir el desarrollo de resistencias a TKIs.



# ABSTRACT



## Introduction

Acute myeloid leukemia is a remarkably heterogeneous blood cancer characterized by the uncontrolled expansion of myeloid progenitor cells from the hematopoietic system. It is the most frequent type of leukemia in adults and the second most common in children. Incidence and mortality rates rise with patients' age. For this reason, the disease usually affects the population over 65 years of age, who present a 5 – year survival rate less than 13.5 %.

Regardless of the increasing knowledge of the molecular pathogenesis of the disease, treatment has not substantially changed in the last few decades. Despite the recent approval of several drugs for AML treatment, all of them are far from being totally effective. In fact, the response to treatments is usually insufficient and patients develop resistance mechanisms, being this deficient effectivity of the different available drugs the main responsible for the disease-associated mortality.

In this context, the study of the mechanisms underlying AML drug resistance can be very useful for the identification of biomarkers of treatment response, and for the evaluation of new promising therapeutic strategies that may prevent resistance development or even overcome them if they emerge.

## Objectives

The main purpose of this thesis has been to unravel the molecular processes responsible for resistance to chemotherapy regimens based on cytarabine and to targeted drugs such as tyrosine kinase inhibitors. Consequently, new biomarkers of pharmacological response have been proposed, along with different treatment alternatives that are expected to achieve considerable benefits at the clinical level.

## Materials and methods

To achieve the objectives proposed in this thesis, publicly available data have been used, as well as samples from patients diagnosed of AML or other myeloid diseases (MPN and MDS), samples from healthy donors, and different human cell lines. Furthermore, pharmacologically resistant cell models, which mimic the characteristics found in AML patients, have been generated. These materials have been employed to perform techniques of nucleic acid analysis, such as gene expression studies by quantitative PCR, as well as DNA and RNA sequencing studies. Likewise, protein analysis

techniques such as phospho-proteomics studies or histopathology, immunohistochemistry and western blotting techniques have been used. Ultimately, several experiments have been carried out to evaluate the pharmacological response, in *in vitro* and *ex vivo* models, such as dose-response experiments to drugs used in monotherapy or in combination, toxicity studies in primary cultures, and finally, the efficacy and safety of the selected therapies in an *in vivo* model of the disease.

## Results

On the one side, the study of cytarabine resistance mechanisms has allowed the identification of alterations in the phosphorylation of certain components of the splicing complex. Based on the presented results, the presence of higher phosphorylation levels of SR proteins at diagnosis has been related to a lack of cytarabine responsiveness. Furthermore, these variations have been linked to failures in the functionality of the spliceosome. The evaluation of different therapeutic strategies has shown the usefulness of combining the splicing inhibitor, H3B-8800, with the Bcl-2 inhibitor, venetoclax, as an effective therapeutic option for the treatment of both, cytarabine-sensitive or resistant AML. The combination of these drugs has shown to be effective and safe in *ex vivo* experiments, thereby suggesting a promising treatment for AML.

On the other side, the analysis of the processes involved in tyrosine kinase inhibitors resistance has shown the activation of the ERK1/2 survival pathway as an evasion mechanism to the effectiveness of this treatment. This activation has been detected in *ex vivo* samples from AML patients and has been validated in different *in vitro* resistant models. Concomitant inhibition of the FLT3 receptor and the ERK1/2 signalling pathway has proved to be effective for the treatment of AML regardless of *FLT3* mutational status. In particular, the combination of midostaurin with trametinib has demonstrated its utility *in vitro* in the TKI-resistant model, avoiding drug-resistance development, as well as generating an effective and safe inhibition in *ex vivo* samples. Additionally, this combination has been able to improve survival in a murine model of AML, controlling the progression of the disease for a longer period compared to the monotherapy-treated groups. Therefore, the combined use of both drugs is proposed as a plausible strategy for the treatment of AML patients with wildtype or mutated *FLT3*.

## Conclusions

In summary, the results presented in this work show the implication of post-translational alterations in certain components of the spliceosome complex during cytarabine resistance. Specifically, the quantification of the phosphorylation levels of SR proteins is proposed as a predictive biomarker of response to the compound which could serve to distinguish between those patients who could benefit from its use or not. Likewise, the combined use of H3B-8800 with venetoclax is proposed as a therapeutic option for the treatment of patients with *de novo*, or refractory / relapsed AML after a cytarabine-based treatment.

Additionally, the activation of the ERK1/2 survival pathway has been evidenced as a feasible mechanism of pharmacological resistance to tyrosine kinase inhibitors, both in *in vitro* models of wildtype and mutated *FLT3*, which can be used as a biomarker of response to TKIs. The concomitant inhibition of the *FLT3* receptor and the ERK1/2 resistance pathway is postulated as an interesting therapeutic strategy for the treatment of AML patients, which also aids to prevent the development of TKI-resistance.

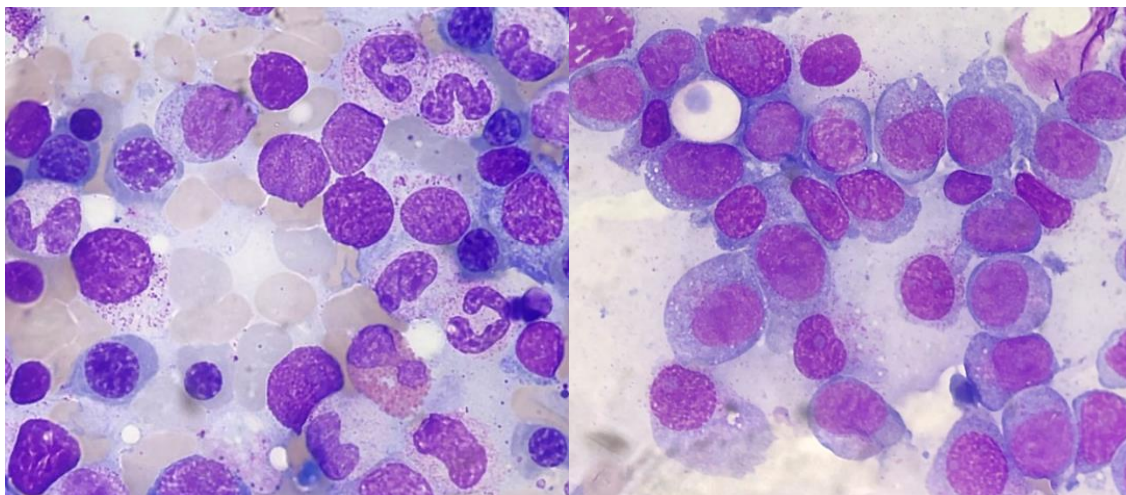


# 1. INTRODUCCIÓN





Se estima que las leucemias mieloides agudas secundarias suponen el 10 – 30 % de todos los casos de LMA <sup>3</sup>. En un 7 – 15 % de los casos se hablaría de leucemias secundarias relacionadas con la terapia (LMA-t) <sup>10</sup>. No obstante, el porcentaje de leucemias secundarias a enfermedades mielodisplásicas (LMA-s) es difícil de determinar debido al gran porcentaje de casos de este tipo que no han sido previamente diagnosticados de otra patología.

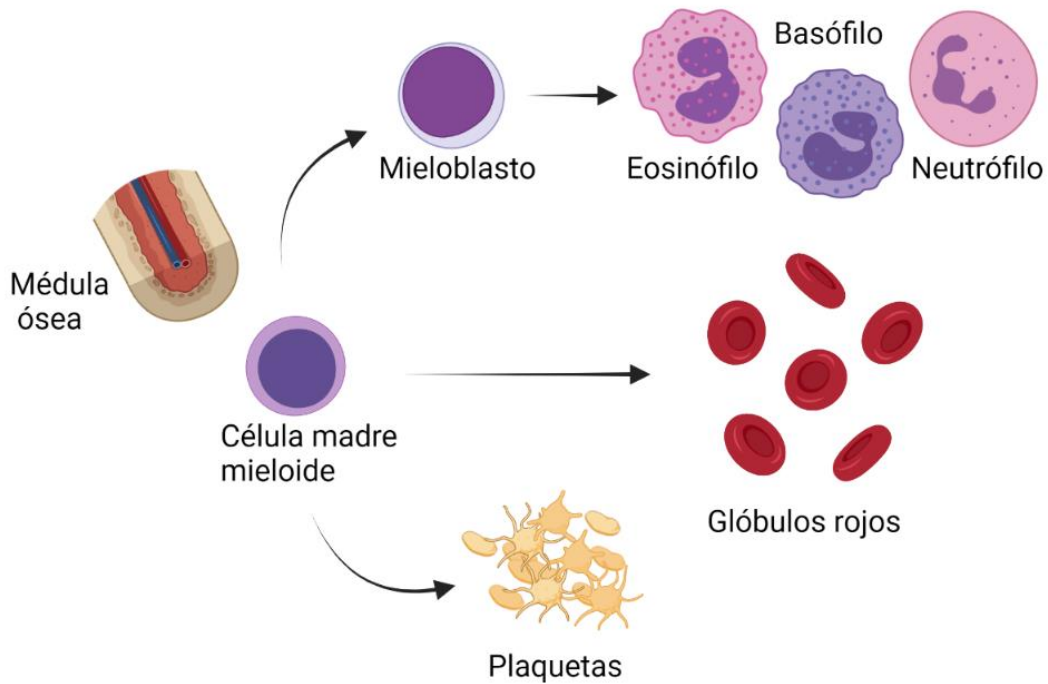


**Figura 2. Poblaciones hematológicas en un contexto sano y patológico.**

Comparativa del perfil citológico de células de médula ósea de un donante sano (panel izquierdo) y un paciente enfermo con leucemia mieloides aguda (panel derecho), donde puede apreciarse la expansión clonal de células progenitoras hematopoyéticas malignas en el contexto patológico. Imágenes tomadas a partir de muestras del Hospital 12 de Octubre.

### 1.1.1. SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas asociados a la enfermedad son inespecíficos y vienen explicados por la proliferación de los blastos, los cuales se acumulan en médula ósea, alterando el proceso normal de hematopoyesis <sup>1</sup>. Estas células alteradas en médula ósea reemplazan a la celularidad habitual de la misma, provocando una disminución en las tres series hematopoyéticas que componen la sangre periférica, produciendo neutropenia, anemia y trombocitopenia <sup>11</sup> (consulte la figura 3).



**Figura 3. Proceso normal de hematopoyesis.**

Los precursores mieloide se encargan de la generación de glóbulos blancos (eosinófilos, basófilos y neutrófilos), glóbulos rojos y plaquetas. Cuando se presenta la proliferación descontrolada de progenitores mieloide se provoca la disminución de las tres series hematopoyéticas, produciendo neutropenia, anemia y trombocitopenia. Imagen generada con BioRender.

En consecuencia, la LMA se suele acompañar de infecciones y fiebre debidas a la neutropenia, sensación de cansancio, debilidad, mareos, palidez causados por la anemia, y de hemorragias o hematomas derivados de la trombocitopenia <sup>1,4</sup>. Además, las células malignas, o blastos, pueden proliferar en otros órganos, ocasionando hepatomegalia y/o esplenomegalia o adenopatías, e incluso infiltrar el sistema nervioso central u otros órganos no hematopoyéticos <sup>11</sup>.

A lo largo de esta introducción se detallan las características epidemiológicas de la leucemia mieloide aguda y su clasificación según los principales organismos mundiales. También se describen las alteraciones moleculares más comunes que se presentan y algunos de los fármacos empleados en la clínica o que están en fase de desarrollo para el tratamiento de la enfermedad. Además, se incluye un apartado sobre los mecanismos de resistencia farmacológica que se han descrito para los distintos tratamientos disponibles y también otro apartado enfocado a las perspectivas futuras de la enfermedad.

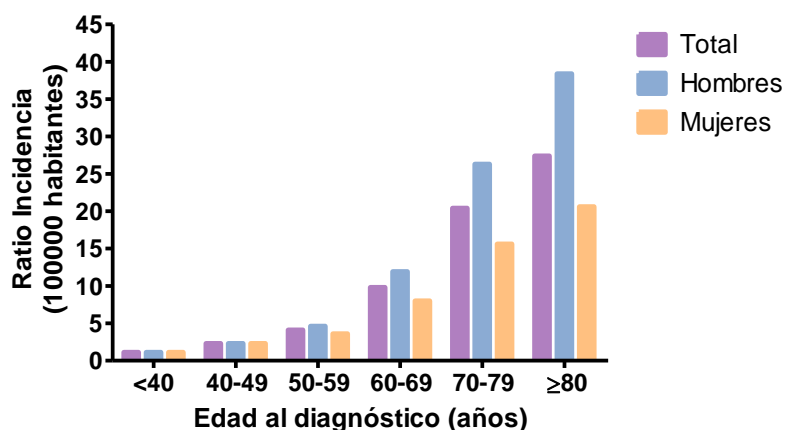
## 1.2. EPIDEMIOLOGÍA

### 1.2.1. INCIDENCIA

La LMA supone el 90 % de las leucemias en adultos, y en torno al 15 – 20 % de las leucemias infantiles, siendo el segundo tipo de leucemia más común en niños <sup>3,12,13</sup>.

La incidencia de la enfermedad ha ido aumentando con el paso del tiempo, llegando actualmente a un ratio de 4,2 casos por cada 100000 habitantes al año <sup>3</sup>. Además, su incidencia se incrementa conforme aumenta la edad (observe la figura 4), siendo el 54 % de todos los pacientes diagnosticados adultos mayores de 65 años <sup>4,6</sup>, por lo que se la considera como una enfermedad principalmente de personas ancianas <sup>3</sup>.

Aunque aparece ligeramente más asociada a hombres que a mujeres <sup>14</sup>, con una incidencia de 5,42 o 3,47 por cada 100000 habitantes al año respectivamente <sup>3</sup>, aún no se conoce una causa asociada a ello.



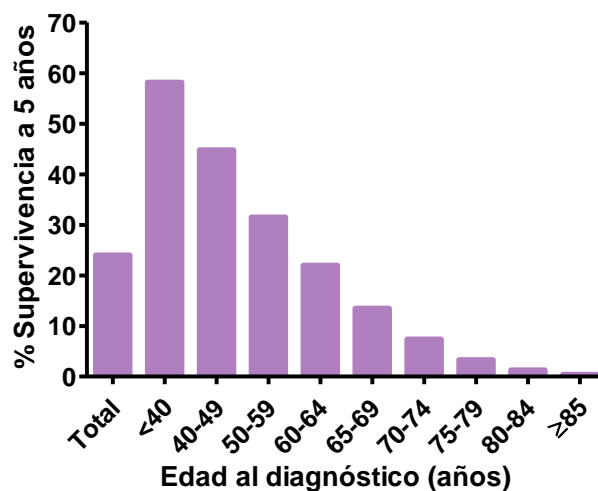
**Figura 4. Incidencia de LMA en los Estados Unidos (EE. UU.) por edad y género, periodo 2011 – 2016.**

Se puede apreciar el aumento de la incidencia en relación con el aumento de la edad al diagnóstico. Figura adaptada desde Shallis R.M. y colaboradores <sup>3</sup>.

Además, se ha relacionado la existencia de ciertas enfermedades congénitas con mayor predisposición a desarrollar la leucemia mieloide aguda, como son la anemia de Fanconi, el síndrome de Down, el síndrome de Klinefelter <sup>14</sup>, el síndrome de Li-Fraumeni o la neurofibromatosis <sup>15</sup>.

### 1.2.2. MORTALIDAD

La mortalidad asociada a la enfermedad varía con la edad, el género y las comorbilidades presentes en los pacientes <sup>3</sup>. Mientras que el 60 – 70 % de los niños con LMA alcanzan respuestas a largo plazo con los tratamientos actuales <sup>16</sup>, y los pacientes adultos diagnosticados antes de los 40 años presentan una supervivencia global a 5 años del 58,2 %, el panorama es desalentador conforme aumenta la edad de diagnóstico <sup>17</sup>. El porcentaje de supervivencia global a 5 años desciende 10 puntos por cada aumento de década de edad al diagnóstico, descendiendo hasta el 0,4 % para aquellos pacientes que superan los 85 años en el momento en el que se detecta la enfermedad <sup>17</sup> (consulte la figura 5).



**Figura 5. Porcentaje de supervivencia global a 5 años de LMA en los EE. UU. por edad, periodo 2011 – 2016.**

Se puede apreciar una disminución de alrededor de 10 puntos por cada incremento de década de edad en el momento del diagnóstico. Figura adaptada desde Shallis R.M. y colaboradores <sup>3</sup>.

De hecho, la diferencia entre la respuesta de niños y adultos se explica principalmente por la mayor tolerancia de los niños a los tratamientos intensivos, menor prevalencia de otras comorbilidades y más medidas de cuidados de soporte intensivos <sup>16</sup>.

En resumen, la LMA es el cáncer sanguíneo más letal, donde de media, 3 de cada 4 personas mueren en un plazo de 5 años <sup>18</sup>. A pesar de que recientemente se han aprobado varios fármacos para su tratamiento, la mejoría de la supervivencia es claramente insuficiente, y es indispensable el estudio de los mecanismos de resistencia farmacológica a los tratamientos disponibles.

### 1.3. CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD

El diagnóstico de la LMA se basa en la presencia de un mínimo de 20 % de blastos aberrantes en sangre periférica o médula ósea <sup>19</sup>. Para diagnosticar la patología y enfocar el tratamiento más adecuado en cada caso, se realizan diversos estudios (citológicos, inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares) que permiten la caracterización y estratificación de la enfermedad.

Dado que la LMA constituye un grupo heterogéneo de hemopatías con diferente etiología, patogenia, historia natural y pronóstico, su estratificación ha permitido reducir dicha heterogeneidad e identificar subgrupos biológicamente diferentes que pueden ser beneficiarios de distintas opciones terapéuticas, lo que ha permitido mejorar el pronóstico de los enfermos de LMA <sup>11</sup>.

A continuación, se detallan las tres clasificaciones más relevantes de la enfermedad, las clasificaciones del grupo cooperativo Franco – Americano – Británico (FAB), de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y del grupo europeo para la leucemia o *European Leukemia Net* (ELN).

#### 1.3.1. **CLASIFICACIÓN DE LA FAB**

La clasificación de la FAB distingue entre distintos subtipos de LMA atendiendo al tipo y grado de madurez de los blastos invasores presentes en las muestras de médula ósea. Atendiendo a ello, se diferencian 8 subtipos principales de LMA <sup>11,20</sup> (véase la tabla 1):

Tipo FAB	Definición
M0	Leucemia mieloide aguda mínimamente diferenciada
M1	Leucemia mieloide aguda sin maduración
M2	Leucemia mieloide aguda con maduración
M3	Leucemia promielocítica aguda (LPA)
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M5	Leucemia monocítica aguda
M6	Leucemia eritroide aguda
M7	Leucemia megacarioblástica aguda

**Tabla 1. Clasificación de la FAB.**

Se distinguen 8 subtipos de LMA atendiendo a sus características citomorfológicas.

### 1.3.2. CLASIFICACIÓN DE LA OMS

La clasificación de la OMS, al contrario de la FAB, tiene en cuenta la presencia de alteraciones genéticas y moleculares que presentan impacto en el pronóstico de la enfermedad. Así, la LMA se divide en varios subgrupos <sup>19</sup> (consulte la tabla 2):

<b>1) LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes, subtipos principales</b>
LMA con traslocación (t) en cromosomas 8 y 21; t (8, 21) (q22; q22) LMA con inversión (16) (p13q22) o t (16; 16) (p13.1; q22) LMA con t (15; 17) (q22; q12) LMA con t (9; 11) (p22; q23) LMA con t (6; 9) (p23; q34) LMA con inversión (3) (q21q26.2) o t (3; 3) (q21; 26.6) LMA (megacarioblástica) con t (1; 22) (p13; q13)
<b>2) LMA con displasia multilinea</b>
LMA secundaria a un síndrome mielodisplásico o mieloproliferativo (LMA-s) LMA no secundaria
<b>3) LMA relacionada con tratamientos previos</b>
LMA relacionadas con la terapia (LMA-t)
<b>4) LMA relacionada con el síndrome de Down</b>
<b>5) Otras LMA, no especificada</b>
LMA mínimamente diferenciada (M0) LMA sin maduración (M1) LMA con maduración (M2) Leucemia mielomonocítica aguda (M4) Leucemia monocítica o monoblástica aguda (M5) Leucemia eritroide aguda (M6) Leucemia megacarioblástica aguda (M7) Leucemia basófila aguda Panmielosis con fibrosis aguda Sarcoma mieloide
<b>6) Leucemia aguda (LA) con ambigüedad de línea</b>
LA indiferenciada LA bilineal LA bifenotípica

**Tabla 2. Clasificación de la OMS.**

Se distinguen 6 subtipos principales de LMA atendiendo a alteraciones genéticas con valor pronóstico.

### 1.3.3. CLASIFICACIÓN DE LA ELN

Una clasificación más simplificada del riesgo es la propuesta por parte del grupo europeo ELN <sup>21</sup>, descrita a continuación (observe la tabla 3):

Riesgo pronóstico	Alteraciones genéticas
<b>FAVORABLE</b>	t (8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> <sup>bajo¶</sup> <i>CEBPA</i> bialélico mutado
<b>INTERMEDIO</b>	<i>NPM1</i> mutado y <i>FLT3-ITD</i> <sup>alto¶</sup> <i>NPM1</i> no mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> <sup>bajo¶</sup> (#) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> <sup>§</sup> Alteraciones no clasificadas en riesgo favorable / adverso
<b>ADVERSO</b>	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); reordenamiento de <i>KMT2A</i> t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2</i> , <i>MECOM (EVI1)</i> -5 o del(51); -7; -17/abn(17p) Cariotipo complejo <sup>Ⓟ</sup> ; Monosomías <sup>Ⓟ</sup> <i>NPM1</i> no mutado y <i>FLT3-ITD</i> <sup>alto¶</sup> <i>RUNX1</i> mutado <sup>¶</sup> <i>ASXL1</i> mutado <sup>¶</sup> <i>TP53</i> mutado <sup>ε</sup>

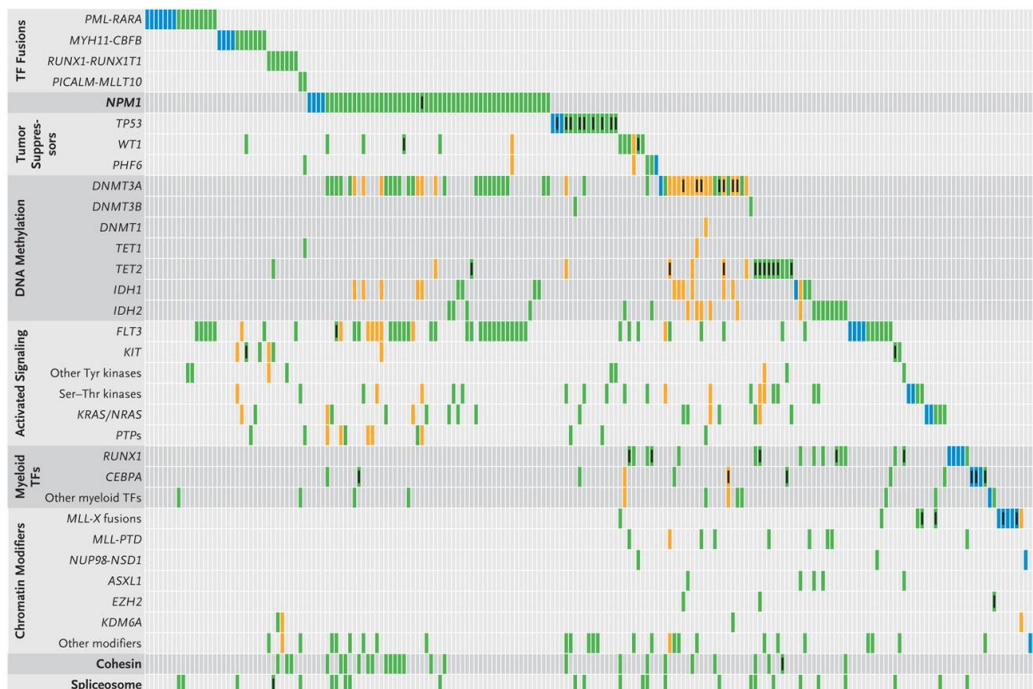
**Tabla 3. Clasificación de la ELN.**

Se distinguen tres grupos de riesgo atendiendo a criterios moleculares. <sup>bajo¶</sup>, ratio (FLT3-ITD / FLT3 no mutado) < 0,5; <sup>alto¶</sup> ratio (FLT3-ITD / FLT3 no mutado) ≥ 0,5; (#), en ausencia de lesiones genéticas de riesgo adverso; <sup>§</sup>, la presencia de t(9;11)(p21.3;q23.3) tienen prioridad sobre las mutaciones genéticas de riesgo adverso; <sup>Ⓟ</sup>, tres o más anomalías cromosómicas no relacionadas en ausencia de una de las traslocaciones o inversiones recurrentes designadas por la OMS, es decir, t(8;21), inv(16) o t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) o t(3;3), LMA con BCR-ABL1; <sup>Ⓟ</sup>, definido por la presencia de una monosomía única (excluida la pérdida de X o Y) en asociación con al menos una monosomía adicional o anormalidad cromosómica estructural (excluyendo CBF); <sup>¶</sup>, estos marcadores no deben emplearse como un marcador de pronóstico adverso si coocurren con subtipos de LMA de riesgo favorable; <sup>ε</sup>, las mutaciones en TP53 se asocian significativamente con la LMA de cariotipo complejo y monosómico.

## 1.4. BASES MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD

Por el momento la etiología de la enfermedad no está clara. Algunos estudios la relacionan con factores regionales como la radiación ionizante, la exposición química, el alcoholismo, el tabaquismo, así como a algunas infecciones virales <sup>4</sup>. Si bien es cierto que la ocurrencia y desarrollo de la LMA es un proceso complejo y la patogénesis de la enfermedad no se ha descrito completamente <sup>4</sup>.

Hoy en día, se conoce que la población blástica está enriquecida en varias mutaciones somáticas conductoras o *driver* adquiridas, y que en la enfermedad coexisten clones competitivos, que consecuentemente son responsable de la evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo <sup>21</sup>. Los estudios en grandes cohortes de pacientes, como los realizados en el proyecto de la red del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) para LMA (TCGA-LAML) <sup>22</sup>, han permitido describir la implicación de 23 genes comúnmente mutados en la enfermedad, clasificados en 9 categorías funcionales: fusiones de factores de transcripción, gen *NPM1*, genes del complejo del espliceosoma, genes de señalización celular, genes supresores de tumores, genes relacionados con la metilación del ADN, genes modificadores de la cromatina, factores de transcripción de genes mieloides, y genes del complejo de cohesinas <sup>21</sup> (consulte la figura 6).



**Figura 6. Clasificación de las mutaciones presentes de manera recurrente en LMA por categorías funcionales.**

Se muestran mutaciones somáticas no sinónimas de 200 pacientes de LMA *de novo* categorizados por grupos funcionales. 199 de 200 pacientes presentaron al menos una mutación génica en alguna de las 9 categorías funcionales presentadas <sup>22</sup>.

También se ha estudiado el perfil mutacional de los pacientes por subgrupos de origen (LMA *de novo*, LMA-s o LMA-t) y se ha vinculado la presencia de mutaciones en *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR* o *STAG2* con el 95 % de los casos de LMA-s, puesto que son mutaciones que aparecen comúnmente en SMD <sup>23</sup>. Mientras que el comportamiento de las LMAs relacionadas con la terapia se vincula con un perfil mutacional similar al de las LMAs *de novo* (mutaciones en *NPM1*, *FLT3*, *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2* y *WT1*) <sup>23</sup>.

A pesar de la presencia de estas mutaciones recurrentes, la LMA es uno de los cánceres que presenta menor número de mutaciones de entre todos los cánceres de población adulta, con una media de 13 mutaciones génicas <sup>22</sup>.

Por ello, es de esperar que otros estudios funcionales revelen distintos tipos de alteraciones no relacionadas con mutaciones genéticas, aumentando así la gran complejidad que caracteriza a esta enfermedad.

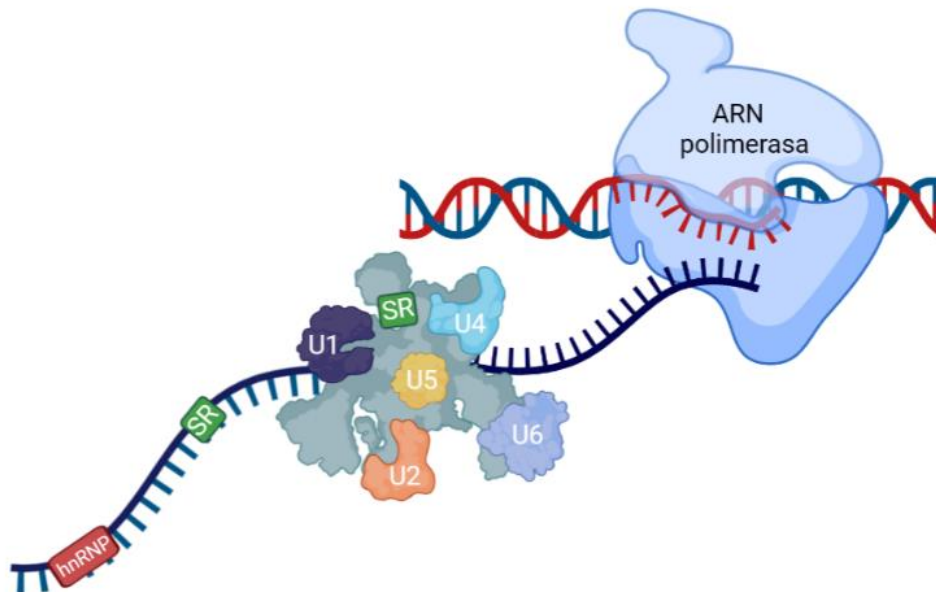
### **1.4.1. ALTERACIONES EN EL MECANISMO DE CORTE Y EMPALME DEL ARN MENSAJERO**

#### **1.4.1.1. Maquinaria de corte y empalme del ARN mensajero**

Para llevar a cabo el proceso de expresión génica en organismos eucariotas, la información genética contenida en el ADN se transcribe a pre- ARN mensajero, el cual posteriormente sufre una serie de modificaciones postranscripcionales. Dichas modificaciones conforman el proceso de corte y empalme, o *splicing*, que consiste en la eliminación de las secuencias intrónicas y unión de las secuencias exónicas flanqueantes, creando así, un marco abierto de lectura en el ARN mensajero que puede traducirse a la generación de proteínas <sup>24</sup>.

Mientras que algunas secuencias se procesan de manera constitutiva, y están presentes en todos los ARN mensajeros generados a partir de un mismo pre- ARN mensajero, otras pueden sufrir un proceso de corte y empalme alternativo, produciendo distintos tipos de ARNs mensajeros. Estos mecanismos alternativos pueden originar diferentes isoformas proteicas con distintas propiedades funcionales, o intervenir en la regulación de los niveles de expresión del gen en cuestión <sup>25</sup>, aumentando así la complejidad del proteoma <sup>26,27</sup>.

Este proceso está catalizado por la maquinaria de corte y empalme, o espliceosoma, un complejo macromolecular que involucra a 5 ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (las *small nuclear ribonucleoproteins*, snRNPs U1, U2, U4, U5 y U6), que reconocen secuencias nucleotídicas conservadas alrededor de cada unión intrón – exón <sup>25</sup>, y alrededor de 200 proteínas, factores de *splicing*, la mayoría de ellas, proteínas ricas en secuencias de serina/arginina (SR) (proteínas SR) y ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*, hnRNPs) <sup>28</sup> (observe la figura 7).



**Figura 7. Maquinaria de corte y empalme del ARN mensajero.**

La maquinaria del espliceosoma se compone de 5 ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (U1, U2, U4, U5 y U6), y alrededor de 200 proteínas, (mayoritariamente proteínas SR y hnRNPs). Imagen generada con BioRender.

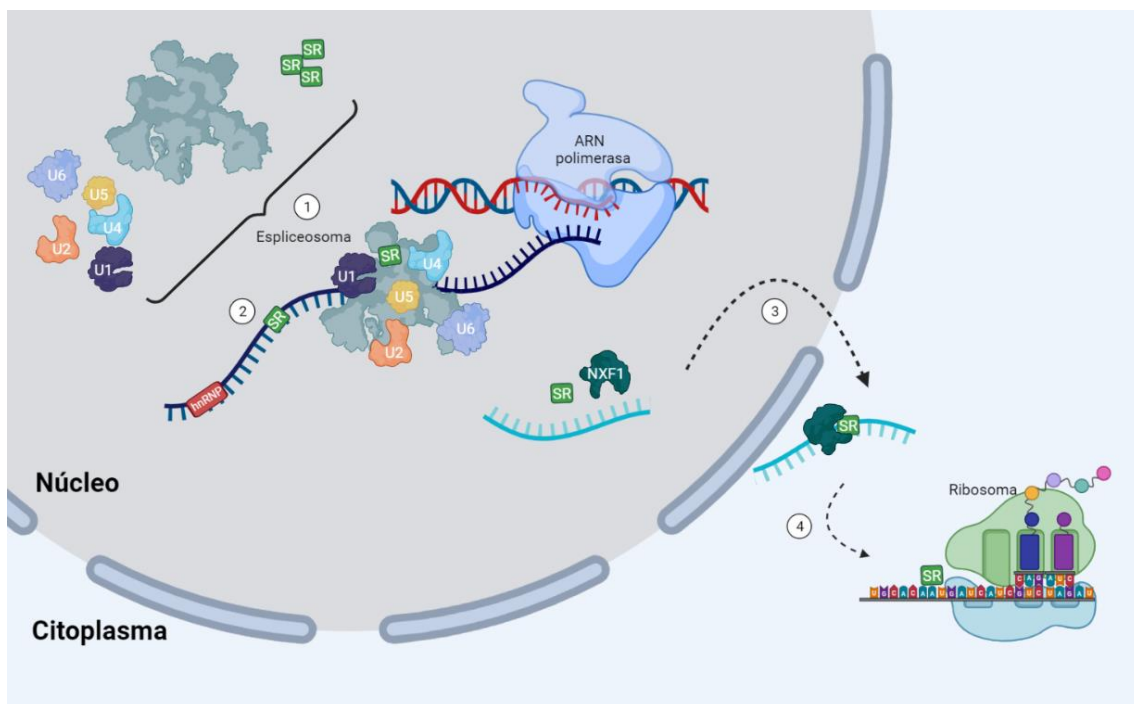
Las proteínas SR se caracterizan por estar altamente conservadas a nivel evolutivo y presentar una región rica en dipéptidos de serina (S) / arginina (R) en el dominio carboxi – terminal, que participa en la interacción proteína – proteína <sup>29</sup>, y habitualmente, uno o dos motivos de reconocimiento de ARN (*RNA recognition motif*, RRM) en el dominio amino – terminal <sup>30,31</sup>. Las proteínas SR más conocidas son SRSF 1 – 12 <sup>32</sup>, además de las proteínas SRRM 1 – 2.

### 1.4.1.2. Funcionalidad normal

Las proteínas SR funcionan principalmente a través de su interacción con otras proteínas que contienen dominios SR<sup>29,33,34</sup> o con otros factores de *splicing* críticos<sup>35-37</sup>.

La mayoría de ellas se localizan de manera dinámica en el núcleo, entre la cromatina y los gránulos de intercromatina o *nuclear speckles*, regiones donde se sitúan los complejos intermediarios de la maquinaria de corte y empalme<sup>38</sup>, participando en el ensamblaje de esta<sup>39-41</sup>, así como en la selección del sitio de corte en el ARN mensajero<sup>29</sup>.

Algunas proteínas SR pueden, además, trasladarse entre el núcleo y el citoplasma<sup>42</sup> participando junto con el factor 1 de exportación de ARN nuclear (NXF1) en el transporte de ciertos ARNs mensajeros<sup>43</sup> o regulando la traducción de proteínas en el citoplasma<sup>42</sup> (véase la figura 8).



**Figura 8. Funciones de las proteínas SR.**

(1) Ensamblaje del complejo de corte y empalme, (2) selección del sitio de corte en el ARN mensajero, (3) transporte núcleo – citoplasma de ARNs mensajeros y (4) regulación de la traducción de proteínas en el citoplasma. Adaptado desde Jeong S. y colaboradores<sup>42</sup>. Imagen generada con BioRender.

Los mecanismos que lideran la actividad del espliceosoma y su regulación son principalmente modificaciones post-traduccionales en las proteínas factores de *splicing* con diversas consecuencias en su actividad, localización subcelular, o degradación proteasomal <sup>25,28,38</sup>.

Estas proteínas son sujeto de tres tipos de modificaciones post-traduccionales: metilación, acetilación, y fosforilación, siendo el ciclo de fosforilación / desfosforilación el principal regulador del proceso de corte y empalme, puesto que las proteínas SR pueden tener funciones totalmente diferentes en distintos estados de fosforilación <sup>39</sup>.

A este respecto, el complejo del espliceosoma alberga numerosas enzimas que introducen o eliminan las modificaciones post-traduccionales y regulan, por tanto, la actividad esencial de las proteínas SR <sup>26</sup>.

Se han descrito diversos modificadores del estado de fosforilación de las proteínas espliceosomales que finalmente modulan la funcionalidad de las proteínas SR, entre los que destacan varias quinasas (SRPK1-3, quinasa Prp4, quinasa Clk1-4/Sty, NEK2, PAK, PKC, DYRKs, quinasa Cdc2, MAPK, AKT y la topoisomerasa 1) <sup>24,26,39,44,45</sup>, además de otras proteínas reguladoras como GSK3 $\beta$  <sup>25,46</sup>, la vía de señalización PI3K y Wnt, o señales de microambiente tumoral <sup>25</sup>.

En resumen, las proteínas SR están involucradas en la regulación cualitativa (*splicing*) y cuantitativa (expresión) del programa de expresión génica de las células. Por ende, su desregulación, podría afectar directa o indirectamente a muchos eventos celulares a través del propio proceso de corte y empalme <sup>27</sup>.

#### **1.4.1.3. Funcionalidad alterada**

En LMA, hay un cúmulo de evidencias científicas que demuestran que el corte y empalme alterado de ciertos genes es una característica común, y, que, además, algunos de esos ARNs mensajeros mal ensamblados podrían traducirse a proteínas con funciones alteradas que contribuyan al proceso de leucemogénesis <sup>47</sup>, progresión cancerígena <sup>28,48,49</sup>, y en consecuencia, presenten impacto a nivel pronóstico <sup>25,45,47</sup>.

Las principales alteraciones del *splicing* en cáncer se han relacionado con mutaciones en la maquinaria del espliceosoma <sup>28,35,44,47,50</sup>, alteraciones en la expresión de sus componentes <sup>25,27,51</sup> o variaciones funcionales de la misma <sup>49,52,53</sup>.

Algunos grupos han descrito la presencia de ciertas mutaciones en *SRRM2* en carcinoma papilar tiroideo <sup>35</sup> o en LMA subtipo M3 de la clasificación de la FAB <sup>50</sup>. Otros, han vinculado las mutaciones en *SRSF2* con anemia, leucopenia y displasia morfológica en tumores mieloides a través de alteraciones en el mecanismo de corte y empalme <sup>48</sup>.

De hecho, algunas mutaciones en factores de *splicing* se han descrito como un sello distintivo en síndromes mielodisplásicos <sup>44,54</sup>, y, por tanto, también, en leucemias mieloides agudas secundarias a SMD, donde sirven como indicadores de pronóstico desfavorable <sup>47</sup>.

Por otro lado, diversos estudios relacionan las alteraciones en los niveles de expresión de ciertas proteínas SR con cáncer <sup>25,27,55-58</sup>, ya que pueden actuar como onco-proteínas cuando se sobre-expresan en el contexto celular adecuado <sup>27</sup>. Ejemplos de ello son la sobre-expresión de *SRSF1* <sup>27</sup>, *SRSF3* <sup>56</sup> o *SRSF6* en cáncer de pulmón y colon, entre otros <sup>57</sup>.

Asimismo, los estudios de secuenciación de ARN han mostrado que en general los cánceres se caracterizan por aberraciones en el *splicing* en comparación con el presente en los tejidos sanos <sup>59</sup>.

A este respecto, Adamia S. y colaboradores <sup>60</sup> muestran en un set de 228 pacientes de LMA que el 29 % del transcriptoma presenta *splicing* alternativo en comparación con el de células progenitoras mieloides CD34+. Y, además, describen que las rutas de señalización más afectadas por el *splicing* alternativo en LMA son FLT3, CD13, c-KIT, NOTCH, PI3K, MAPK, vías involucradas en regulación del ciclo celular, apoptosis, transformación celular y *splicing*.

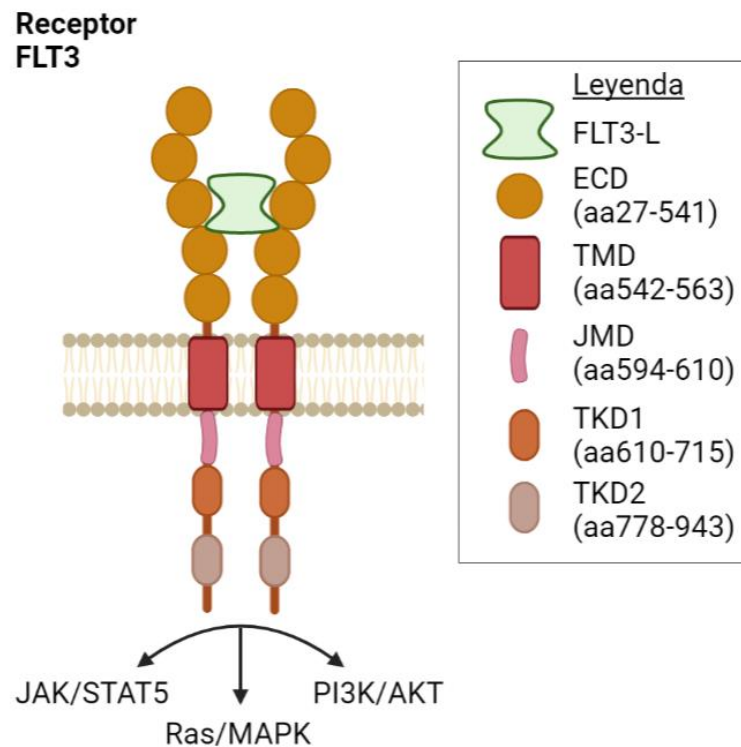
También se han detectado alteraciones en las quinasas que actúan sobre las proteínas SR en cáncer <sup>27,39</sup>. Algunos ejemplos de alteraciones se han descrito en la quinasa SRPK1 implicada en la progresión tumoral en cáncer colorrectal <sup>51</sup>, SRPK2 en cáncer de pulmón, colon o pacientes de LMA <sup>45</sup>, o las quinasas Clk 1 – 4 en cáncer de mama<sup>24,39,45</sup>.

Recapitulando, todas las alteraciones en el proceso de corte y empalme reflejan la selección de variantes con propiedades funcionales que permiten la progresión maligna de células iniciadoras del tumor <sup>25</sup>, convirtiéndolas en dianas interesantes para el tratamiento del cáncer.

## 1.4.2. ALTERACIONES EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

### 1.4.2.1. FLT3

El gen humano CD135 o *FLT3* (del inglés, *FMS-like tyrosine kinase 3*) está localizado en el brazo largo del cromosoma 13 (13q12.2) y codifica una proteína receptora tirosina quinasa de clase 3, compuesta por 993 aminoácidos, organizados en varios dominios (véase la figura 9): un dominio extracelular (ECD) (con 5 fracciones similares a las inmunoglobulinas), un dominio transmembrana (TMD), un dominio intracelular yuxtamembrana (JMD) y dos dominios tirosina quinasa (TKD1-2) <sup>61</sup>.



**Figura 9. Dominios componentes del receptor FLT3.**

FLT3-L, ligando de FLT3; EDC, dominio extracelular; TMD, dominio transmembrana; JMD, dominio yuxtamembrana; TKD1, dominio tirosina quinasa 1; TKD2, dominio tirosina quinasa 2; aa, aminoácido. Adaptado desde Staudt D. y colaboradores <sup>9</sup>. Imagen generada con BioRender.

En situaciones normales, *FLT3* se expresa en células madre multipotentes de tejidos con alta renovación celular como la médula ósea, los órganos linfoides, el timo, la placenta <sup>61</sup>, el hígado y el cerebro <sup>62</sup>. Sin embargo, en condiciones malignas como la LMA, el gen se encuentra sobre-expresado en más del 70 – 100 % de los pacientes <sup>6,13,62-64</sup>, y esta sobre-expresión es independiente al estado mutacional del gen <sup>65</sup>.

La unión del ligando de FLT3 al receptor lidera la dimerización, autofosforilación de este, y la consecuente activación de su dominio tirosina quinasa. El receptor activo, entonces, acciona las vías de señalización subyacentes, JAK/STAT5 (del inglés *Janus kinase / signal transducer and activator of transcription 5*), Ras / MAPK (*Ras / mitogen – activated protein kinase*) y PI3K / AKT (*phosphatidylinositol kinase / AKT*)<sup>66</sup>. La activación de estas vías finalmente resulta en un aumento de la proliferación, descenso de la apoptosis, e inhibición de la diferenciación celular<sup>67</sup>.

En condiciones normales, la actividad del receptor se cesa por autoinhibición en ausencia de la unión del ligando<sup>68</sup>. En este aspecto, el dominio JMD juega un papel crucial evitando que el receptor sufra el cambio conformacional que genera la forma activa<sup>68</sup>.

Sin embargo, un gran porcentaje de los pacientes de LMA presentan mutaciones oncogénicas en *FLT3*, provocando la activación constitutiva del receptor<sup>67</sup>. En *FLT3* se encuentran principalmente duplicaciones internas en tándem (ITD) y mutaciones puntuales.

Por un lado, las mutaciones ITD presentes en un 20 – 35 % de los casos<sup>6,67</sup>, consisten en la inserción de secuencias repetidas de 3 – 400 pares de bases, la mayoría (70 %) en el dominio JMD, mientras que el resto se localizan en el dominio TKD1<sup>61,69,70</sup>.

Por otro lado, las mutaciones puntuales representan el 7 % de los casos<sup>6,71</sup> y suelen ocurrir en los aminoácidos Asp835 (D835) e Ile836 (I836) situados en el dominio TKD2<sup>61</sup>. También se han identificado otras mutaciones puntuales menos frecuentes en una franja de 16 aminoácidos en el JMD (en el exón 14 de *FLT3*)<sup>72</sup>.

Es decir, las mutaciones que afectan al JMD eliminan la propiedad de autoinhibición del receptor, mientras que las mutaciones presentes en el TKD mantienen su actividad quinasa constante.

Así, tanto las mutaciones ITD como las mutaciones puntuales, ya sean en el JMD o el TKD, promueven la activación constitutiva del receptor, que en ausencia de su ligando continúa activando las mismas rutas de señalización que el receptor en su forma salvaje, incluso cuando no son necesarias, derivando en la transformación oncogénica del receptor<sup>70–73</sup>.

#### 1.4.2.2. KIT

KIT o SCFR (del inglés, *stem cell factor receptor*), al igual que FLT3, es un receptor tirosina quinasa de clase 3<sup>13</sup>, cuyos ligandos principales son factores de crecimiento de células madre y está involucrado en diferenciación celular y supervivencia<sup>74</sup>. Aunque las mutaciones en *KIT* se dan en un 5 % de los pacientes de LMA<sup>13</sup>, casi el 80 % de los casos de LMA muestran expresión oncogénica del gen<sup>75</sup>.

#### 1.4.2.3. NRAS

Las mutaciones en *NRAS* son unas de las mutaciones oncogénicas más comunes en cáncer sanguíneo<sup>76</sup>. En LMA, las mutaciones en *NRAS* se dan en un 10 – 15 % de los pacientes<sup>77,78</sup>. Existen estudios que apoyan que las mutaciones adquiridas en *NRAS* corresponden a eventos secundarios en la patogénesis de la LMA, por lo que su significado pronóstico es particularmente incierto<sup>77</sup>. De hecho, los estudios más recientes<sup>78,79</sup> no muestran evidencias claras de que las mutaciones en el gen puedan influir en la supervivencia en adultos, mientras que sí parece afectar en niños con LMA<sup>79</sup>.

### 1.4.3. ALTERACIONES EN LA METILACIÓN DEL ADN

Las mutaciones en la enzima isocitrato deshidrogenasa 1, *IDH1*, ocurren en aproximadamente el 6 – 10 % de los pacientes con LMA, mientras que las mutaciones en *IDH2* son más frecuentes, teniendo lugar en el 9 – 13 % de los enfermos<sup>80</sup>. Las mutaciones en estos genes están generalmente asociadas a edades avanzadas, citogenética de riesgo intermedio y otras mutaciones en *SRSF2*<sup>81</sup>.

Aunque parecen no tener un impacto adverso en el pronóstico de la enfermedad<sup>82</sup>, hay estudios que sí han observado un aumento en la expresión de *IDH1* en pacientes de LMA con cariotipo normal, pero que presentan mal pronóstico<sup>83</sup>.

### 1.4.4. ALTERACIONES EN MECANISMOS PROTECTORES

Las células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés *hematopoietic stem cells*) mantienen la activación de las vías de señalización celular que les permiten sobrevivir y evadir la apoptosis ante condiciones adversas. En consecuencia, cuando se malignizan a células madre leucémicas (LSC, del inglés, *leukemic stem cells*) mantienen toda esta protección propia o derivada del microambiente tumoral<sup>84</sup>.

Entre los mecanismos protectores presentes en la LMA se contemplan: la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, la activación de rutas de auto-renovación como TGF- $\beta$ , *Hedgehog*, Wnt /  $\beta$ -catenina, mayor capacidad de reparación del ADN dañado o autoproducción de factores de crecimiento <sup>84</sup>.

*BCL2* está sobre-expresado en la mayoría de las enfermedades mieloides como una vía promotora de la supervivencia, y además representa un mecanismo de resistencia y progresión de la enfermedad <sup>85</sup>. En LMA se ha asociado con peores respuestas al tratamiento, y por tanto se considera una diana terapéutica lógica <sup>86</sup>.

Por otro lado, la activación aberrante de la vía de señalización *Hedgehog* también se ha descrito en células madre malignas, que necesitan su activación para el mantenimiento y expansión celular <sup>85</sup>. En la LMA se han detectado alteraciones en su señalización, en especial, la sobre-expresión de ciertos miembros de la ruta en células insensibles a quimioterapia<sup>86</sup>.

## **1.5. EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA LMA**

El seguimiento de la enfermedad se realiza mediante estudios citológicos, de inmunofenotipo y moleculares de muestras de sangre periférica o médula ósea en diferentes puntos del tratamiento que permiten cuantificar el porcentaje de blastos presentes en la muestra.

Todos los tratamientos empleados para la leucemia mieloide aguda pretenden alcanzar la remisión completa (RC) de la enfermedad (ausencia de células malignas en MO y SP), permitiendo el restablecimiento de la producción normal de las poblaciones hematopoyéticas.

Se considera que un paciente enfermo de LMA ha alcanzado la RC cuando el porcentaje de blastos en médula ósea es inferior al 5 %.

Si, por el contrario, el porcentaje de blastos observados al diagnóstico no varía sustancialmente o incluso aumenta tras recibir el tratamiento, se denomina resistencia primaria o refractariedad. Otro ejemplo de fallo del tratamiento sería la aparición de recaídas en la enfermedad. En esos casos, los pacientes han alcanzado RC en algún momento a lo largo del tratamiento recibido, pero tras un tiempo muestran la reaparición de la enfermedad, lo que se define como resistencia secundaria o adquirida <sup>8</sup>.

Por un lado, la refractariedad primaria en LMA presenta la mayor dificultad en el manejo clínico de la enfermedad. A los pacientes que muestran refractariedad a la primera línea de tratamiento se les administra tratamiento de rescate, terapias de tratamiento no intensivo, agentes diana - específicos, fármacos bajo investigación en ensayos clínicos y el trasplante alogénico, que es la mejor opción para aumentar la supervivencia a largo plazo<sup>87</sup>. Pero si no son aptos para recibir quimioterapia de rescate o trasplante alogénico se recomienda directamente su inclusión en ensayos clínicos con nuevas terapias en desarrollo<sup>87</sup>.

Por otro lado, el perfilado genómico de las recaídas en LMA ha mostrado dos patrones principales para la progresión de la enfermedad: un clon fundador adquiere nuevas mutaciones y se convierte en el clon fundador de la recaída, o un sub-clon inicial al diagnóstico que sobrevive a la terapia inicial, ganando mutaciones adicionales y que se acaba expandiendo y actúa como el principal responsable de la recaída<sup>16,88</sup>. Sin embargo, dada la gran complejidad de la enfermedad, esta evolución clonal no tiene por qué estar directamente vinculada sólo a mutaciones.

## 1.6. TRATAMIENTOS

A pesar de los avances en el conocimiento de la biología de la enfermedad, el tratamiento no ha cambiado sustancialmente en los últimos años<sup>21,89</sup>. Desde su implementación en 1970, los regímenes de quimioterapia 7 + 3 han permanecido durante décadas como el tratamiento de elección<sup>90</sup>. Y, aunque se han aprobado 8 fármacos nuevos desde 2017 (midostaurina, gilteritinib, vyxeos, enasidenib, ivosidenib, GO, glasdegib y venetoclax), la enfermedad permanece difícil de curar dada la toxicidad asociada a los tratamientos disponibles y los bajos ratios de curabilidad, especialmente en personas mayores<sup>86</sup>.

En general, el 45 – 50 % de los pacientes menores de 60 años, y el 15 – 20 % de los mayores de esa edad que reciben quimioterapia sobreviven. Sin embargo, sólo un 10 % de los pacientes mayores de 70 años que reciben tratamientos no intensivos, alcanza 2 años de supervivencia, y es muy complicado saber qué pacientes pueden beneficiarse de la terapia intensiva o no a esa edad<sup>86</sup>.

Por suerte, los nuevos fármacos en desarrollo han cambiado ligeramente estas cifras, pero no de manera significativa, pues aún queda mucho por mejorar en el tratamiento de la LMA.

### 1.6.1. ESQUEMAS DE QUIMIOTERAPIA

En primer lugar, se realiza una evaluación inicial para determinar si el paciente es apto o no para recibir quimioterapia intensiva de inducción <sup>2</sup>. Así, los pacientes jóvenes, o mayores con buen estado de salud, reciben quimioterapia de inducción y posteriormente, al alcanzar la remisión completa, reciben varios ciclos de quimioterapia de consolidación <sup>91</sup>. Por lo tanto, los esquemas de quimioterapia se componen de dos fases de tratamiento <sup>14</sup>:

1. Tratamiento de inducción: pretenden la desaparición de las células leucémicas de la médula ósea y sangre periférica induciendo a la remisión completa. Consiste en un esquema de tratamiento 7 + 3, donde se infunde citarabina (100 mg/m<sup>2</sup>/d) durante 7 días seguidos, junto con infusiones cortas de una antraciclina (idarrubicina o daunorrubicina, 45 mg/m<sup>2</sup>/d) durante únicamente los 3 primeros días del tratamiento.
2. Tratamiento de consolidación: una vez alcanzada la remisión, se administran varios ciclos de citarabina para acabar con las células leucémicas remanentes y prevenir una futura recaída. La quimioterapia de consolidación puede continuarse por un trasplante autólogo (del propio pacientes) o alogénico (de un donante compatible), según la edad, situación general (comorbilidades y estado basal) y deseos del paciente.

Se estima que aproximadamente el 70 – 75 % de los pacientes de LMA jóvenes (menores de 60 años) y el 50 % de los pacientes mayores alcanzan la remisión completa tras uno o dos ciclos de tratamiento de inducción <sup>92</sup>. Sin embargo, el 85 % de ellos recaen en la enfermedad y progresan <sup>92</sup>. Así que, evitar el desarrollo de resistencias farmacológicas a citarabina es aún una clara necesidad para mejorar el pronóstico de la enfermedad <sup>93,94</sup>.

Además, la estrategia terapéutica actual en LMA ha cambiado ligeramente a raíz de la aprobación de varios fármacos en los últimos años. Actualmente, los esquemas de quimioterapia 7 + 3 pueden darse solos o en combinación con otros tratamientos atendiendo al perfil molecular de cada paciente. Así, por ejemplo, pueden combinarse con el inhibidor tirosina quinasa midostaurina, para el tratamiento de los pacientes que presentan mutaciones en *FLT3*.

### 1.6.2. TERAPIAS DE BAJA INTENSIDAD

En general, los pacientes no aptos para quimioterapia intensiva, si no portan marcadores moleculares asociados a otros fármacos aprobados, son tratados con terapias de baja intensidad.

Estas terapias pueden consistir en ciclos de citarabina a bajas dosis, o el tratamiento con hipometilantes <sup>95</sup>, como azacitidina o decitabina, terapias que habitualmente no generan respuestas duraderas <sup>96</sup>.

### 1.6.3. FÁRMACOS DIANA - ESPECÍFICOS

Hace unos años, las cifras indicaban que los pacientes no aptos para recibir quimioterapia intensiva sobrevivían aproximadamente 10 meses desde el diagnóstico <sup>2</sup>. Por suerte, estas cifras han cambiado ligeramente desde la incorporación de los fármacos diana - específicos en la rutina clínica.

Además, desde que los fármacos diana – específicos mostraron rentabilidad económica para el tratamiento de algunos cánceres, ha habido un incremento abismal en el desarrollo y aprobación por parte de la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) de moléculas pequeñas inhibitoras, que actualmente cuenta con más de 70 inhibidores disponibles<sup>13</sup>.

#### 1.6.3.1. Inhibidores del mecanismo de corte y empalme del ARN mensajero

Dadas las numerosas alteraciones encontradas en el mecanismo de corte y empalme del ARN mensajero en cáncer, muchos grupos de investigación han mostrado interés en la aplicación de inhibidores del proceso como tratamiento farmacológico, basándose en los efectos de ciertas moléculas sobre el estado de fosforilación de algunas proteínas SR, sobre la actividad de quinasas como las SRPK, Clik o enzimas como la topoisomerasa I, o sobre el propio proceso de *splicing* <sup>97</sup>.

De ahí que se hayan iniciado varios ensayos clínicos analizando el potencial terapéutico de los inhibidores de *splicing* <sup>28</sup> en diferentes enfermedades, como los síndromes mielodisplásicos y la LMA (NCT03614728), el linfoma no-Hodgkin (NCT03666988 y NCT02783300) o tumores sólidos avanzados o metastásicos (NCT03854227) <sup>48</sup>.

También, se ha evaluado la inhibición de modificadores post-traduccionales de factores de *splicing* <sup>27</sup>, como los fármacos SPHINX31, que inhibe la actividad de las quinasas SRPK1, SRPK2 y Clik1, o SRPKIN-1, inhibidor de las quinasas SRPK1 y SRPK2 <sup>98</sup>, ambos en fase de investigación preclínica.

Otros autores se han centrado en la investigación preclínica de inhibidores del espliceosoma, como madrasin, fármaco que interfiere en los primeros pasos del ensamblaje del complejo, infiriendo así en la reacción de corte y empalme del ARN mensajero <sup>99</sup>.

Sin embargo, los mejores resultados observados hasta el momento en ensayos clínicos se aprecian con el uso de inhibidores de SF3B1, componente de la maquinaria de corte y empalme del ARN mensajero, y que, por tanto, también actúan sobre los primeros pasos del ensamblaje del espliceosoma.

En 2007 se abrió un ensayo clínico con el inhibidor de SF3B1, E7107, para el tratamiento de pacientes con tumores sólidos en estado avanzado que presentaran multirresistencia farmacológica. A pesar de los buenos resultados obtenidos en la fase preclínica, dos de los pacientes incluidos desarrollaron pérdidas de visión, por lo que se discontinuó el ensayo <sup>48</sup>.

No obstante, en 2016, se abrió un ensayo clínico para testar la eficacia de otro inhibidor de SF3B1, el fármaco H3B-8800, para pacientes con SMD, LMA o leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) (NCT02841540), y afortunadamente, de momento los resultados no muestran evidencias de toxicidades oftalmológicas graves o de otro tipo que puedan vincularse al tratamiento <sup>100</sup>.

Además, se ha descrito que este inhibidor, aunque muestra mayor inhibición cuando SF3B1 está mutado, también reprime la forma salvaje del gen, al igual que ocurre en los mutantes en SRSF2 <sup>59,101</sup>.

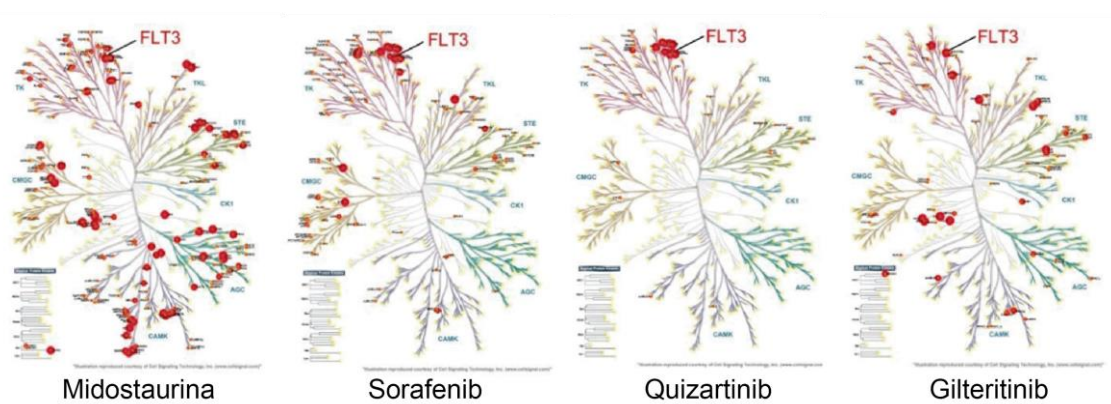
### **1.6.3.2. Inhibidores de FLT3**

Como se ha descrito previamente, las alteraciones en *FLT3*, tanto a nivel mutacional como a nivel de expresión, son una característica muy común en los enfermos de LMA. Este hecho convierte a FLT3 en una diana terapéutica bastante atractiva, frente a la cual se han desarrollado un gran número de inhibidores.

A lo largo de los años, se ha ido aumentando la cantidad de inhibidores tirosina quinasa (TKI) con actividad frente a FLT3, todos ellos competidores por los sitios de unión a ATP del receptor <sup>102</sup>. Estos fármacos se subdividen en inhibidores de tipo I (crenolanib, gilteritinib o midostaurina), o de tipo II (sorafenib, quizartinib), dependiendo de la conformación en la que se encuentre el dominio tirosina quinasa del receptor <sup>82</sup>.

Los inhibidores de tipo I se unen al receptor cuando el dominio tirosina quinasa está activo, inhibiendo, por tanto, a *FLT3* con mutaciones en el JMD o el TKD. Mientras que los inhibidores de tipo II actúan sobre el dominio tirosina quinasa en su conformación inactiva, por lo que no muestran inhibición de las mutaciones presentes en el TKD, las cuales mantienen el dominio quinasa activo <sup>103</sup>.

Además, se han clasificado como inhibidores de primera generación, los cuales muestran menos especificidad en la inhibición de *FLT3* (como sorafenib y midostaurina), mientras que los de segunda generación se caracterizan por presentar inhibiciones del receptor más específicas y potentes (como quizartinib, crenolanib y gilteritinib) <sup>104</sup> (observe la figura 10).



**Figura 10. Mapas de las quinasas dianas de los inhibidores tirosina quinasa.**

Se muestran los mapas de quinasas inhibidas por los inhibidores tirosina quinasa midostaurina, sorafenib, quizartinib y gilteritinib. Adaptado desde Staudt D. y colaboradores <sup>9</sup>.

La mayoría de los inhibidores de *FLT3* que se han testado a nivel clínico han mostrado resultados decepcionantes a pesar de lo prometedoros que parecían en los estudios preclínicos. Cuando se han empleado en monoterapia para la LMA, han mostrado la reducción en el conteo de blastos en sangre periférica y médula ósea de una minoría de los pacientes, y estos efectos normalmente han sido transitorios.

El principal problema es que la resistencia farmacológica ocurre a los pocos meses tras iniciarse el tratamiento, afectando así severamente al efecto terapéutico en la clínica. Por ello, la terapia en combinación es una de las estrategias más efectivas para superar estas resistencias <sup>4</sup>.

Actualmente hay dos fármacos aprobados por la FDA para los pacientes de LMA que presentan mutaciones en *FLT3*; midostaurina en tratamiento de primera línea, y gilteritinib para los pacientes refractarios o en recaída.

Además, se están desarrollando otros inhibidores que están en fases finales de ensayo clínico, pendientes de aprobación, como sorafenib, quizartinib o crenolanib, entre otros<sup>61</sup>.

#### **1.6.3.2.1. Midostaurina**

Midostaurina es un inhibidor multiquinasa con actividad inhibidora frente a los receptores tirosina quinasa de tipo 3. Por tanto, inhibe no solo a FLT3, sino también a otros receptores tirosina quinasa como PDGFR, CDK1, Src, c-KIT y VEGFR <sup>105</sup>.

Es activo frente a las mutaciones *FLT3*-ITD y *FLT3*-TKD, y además frente al gen en su forma salvaje <sup>82,105,106</sup>, como se ha sugerido en ensayos clínicos <sup>107</sup>.

Recibió la aprobación por la FDA el 28 de abril de 2017 para el tratamiento de los pacientes de LMA con mutaciones en *FLT3* en combinación con quimioterapia. Tras muchos años bajo investigación, fue la primera droga que recibió la aprobación para LMA en los EE. UU. desde el año 2000 <sup>106</sup>.

Su aprobación se basa en los resultados de supervivencia global reportados en el ensayo clínico CALGB10603 RATIFY <sup>108</sup>. Ahí se demostraba, que, aunque como agente único no tiene utilidad clínica en LMA, claramente reduce los niveles de blastos en sangre periférica y médula ósea, especialmente, cuando se combina de manera segura con la quimioterapia de inducción y consolidación <sup>106</sup>.

La utilidad de la combinación de midostaurina con quimioterapia para el tratamiento de pacientes de LMA que no presentan mutaciones en *FLT3* está en evaluación en un ensayo clínico en fase III (NCT03512197) <sup>86</sup>. Desgraciadamente no se esperan los resultados finales de este ensayo hasta el año 2026 <sup>86</sup>.

#### **1.6.3.2.2. Gilteritinib**

Gilteritinib es un inhibidor altamente selectivo de FLT3 y AXL, otra diana que juega un papel en la activación de FLT3 y se ha implicado en la patogénesis de la LMA <sup>109,110</sup>.

Respecto a FLT3, muestra actividad frente a las mutaciones *FLT3*-ITD, *FLT3*-D835 <sup>82</sup> y *FLT3*-I836 <sup>111</sup>.

Recibió la aprobación por la FDA el 28 de noviembre de 2018 (pero aún no está financiado en España) para su uso en monoterapia en pacientes de LMA refractarios o en recaída con mutaciones en *FLT3* en base a los ratios de respuesta de un ensayo clínico en fase III (ADMIRAL, NCT02421939) <sup>108</sup>.

### 1.6.3.2.3. Otros inhibidores de FLT3

Además de los inhibidores ya presentados, existen otros inhibidores de FLT3 que permanecen bajo investigación y aún no han sido aprobados por la FDA, como sorafenib o quizartinib, los cuales, a pesar de mostrar resultados prometedores a nivel preclínico, muestran gran vulnerabilidad al desarrollo de resistencias <sup>108</sup>.

Sorafenib es un inhibidor multiquinasa que inhibe a FLT3, induciendo el arresto del ciclo celular y apoptosis en las células leucémicas <sup>112</sup>. Además, inhibe otras quinasas como VEGFR, PDGFR, c-KIT, RAF <sup>113</sup>.

Es un inhibidor potente de *FLT3*-ITD, pero no de *FLT3*-D835 o salvaje <sup>82,112</sup>, y está aprobado para el tratamiento de ciertos subtipos de carcinoma hepatocelular, carcinoma celular renal y carcinoma tiroideo.

A pesar de ello, para el tratamiento de la LMA sigue en investigación en ensayos clínicos<sup>114,115</sup>. Un ensayo clínico en fase III demostró la eficacia de sorafenib en pacientes jóvenes de LMA, con mayor supervivencia global, supervivencia libre de recaída y supervivencia libre de enfermedad en el brazo de tratamiento con sorafenib<sup>114</sup>, a pesar de lo cual aún no ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de la LMA.

Por el contrario, quizartinib es un inhibidor potente y altamente selectivo de FLT3, que sólo inhibe otras quinasas como c-KIT o PDGFR <sup>82,116</sup>. Sin embargo, quizartinib sólo es eficaz frente a las mutaciones ITD en *FLT3*, pero no frente a las mutaciones en TKD <sup>117</sup>.

Por ello, a pesar de su selectividad, y los resultados prometedores que ha presentado en ensayos clínicos <sup>118</sup>, se han descrito numerosos mecanismos de resistencia que no han favorecido su empleabilidad clínica para el tratamiento de la LMA, como la adquisición de mutaciones en el dominio TKD de *FLT3* <sup>102</sup>. No obstante, su utilidad junto con quimioterapia estándar para el tratamiento de pacientes con LMA que no presentan mutaciones en *FLT3* está siendo evaluada en un ensayo clínico en fase II (NCT04107727).

En definitiva, hasta el momento se ha evaluado la actividad de numerosos inhibidores de FLT3, muchos de ellos, además en ensayos clínicos. Sin embargo, los inhibidores desarrollados aún están lejos de mostrar eficacia clínica como monoterapia y requieren su combinación con quimioterapia convencional para alcanzar los máximos beneficios terapéuticos <sup>119</sup>.

### **1.6.3.3. Otros inhibidores diana – específicos**

#### **1.6.3.3.1. Inhibidores de la vía RAS/MEK1/2**

Como se ha descrito previamente, las mutaciones en *NRAS* son un evento común en ciertos pacientes de LMA y, aunque se han desarrollado diversos inhibidores de la vía, no muestran resultados excelentes en la práctica clínica. De momento hay dos inhibidores de la vía aprobados por la FDA para el tratamiento del melanoma, trametinib y cobimetinib <sup>120</sup>.

De los dos, trametinib ha mostrado más potencia en la inhibición de MEK1 y MEK2 <sup>120</sup> y mayor reducción de la actividad de ERK <sup>76</sup>. Así, es un inhibidor reversible y específico de MEK 1/2 <sup>121</sup>, que está aprobado por la FDA para su uso en melanoma metastásico con mutaciones BRAF V600 <sup>85,121,122</sup> y se ha evaluado en ensayos clínicos para la LMA (NCT00920140).

Borthakur G. y colaboradores <sup>123</sup>, describen la eficacia de trametinib en este ensayo clínico en fase I/II para pacientes de SMD, LMMC, y LMA en refractariedad o recaída, con o sin mutaciones en *NRAS* o *KRAS*, observando que el fármaco presenta actividad especialmente en pacientes que portan mutaciones en *RAS*.

#### **1.6.3.3.2. Inhibidores de IDH1/2**

Las mutaciones en IDH1/2 también ocurren de manera frecuente en los pacientes de LMA, por lo que los inhibidores de la enzima isocitrato deshidrogenasa están mostrando resultados prometedores en la enfermedad.

Ivosidenib es un inhibidor de IDH1 que está aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con LMA que presentan mutaciones en el gen, ya sean pacientes con LMA de nuevo diagnóstico mayores de 75 años o no aptos para quimioterapia, o pacientes adultos en refractariedad o recaída <sup>104</sup>.

Por el contrario, enasidenib, inhibidor de IDH2, únicamente está aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con LMA en refractariedad o recaída que presentan mutaciones en IDH2 <sup>85</sup>.

#### **1.6.3.3.3. Inhibición de mecanismos protectores**

Se sabe que las células resistentes a quimioterapia muestran activación de mecanismos protectores como la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, o la activación de las rutas de auto-renovación *hedgehog* o Wnt /  $\beta$ -catenina <sup>84</sup>. De ahí que se haya despertado el interés de estudiar inhibidores de estos mecanismos para el tratamiento de los pacientes con LMA.

Por un lado, venetoclax, un inhibidor selectivo de Bcl-2 recibió la aprobación de la FDA en noviembre de 2018 para el tratamiento de la LMA de nuevo diagnóstico de pacientes adultos mayores de 75 años o con comorbilidades que los excluyen de recibir la quimioterapia de inducción.

El tratamiento con venetoclax está aprobado (aunque en España no tiene precio de reembolso) para su uso en combinación con bajas dosis de citarabina o con los agentes hipometilantes azacitidina o decitabina <sup>124</sup>.

Por otro lado, glasdegib es un inhibidor de la vía del erizo o *hedgehog* que recibió la aprobación de la FDA también en noviembre de 2018 y para el mismo grupo de pacientes (enfermos de LMA de nuevo diagnóstico mayores de 75 años o con comorbilidades que los excluyen de recibir la quimioterapia de inducción). En este caso, glasdegib está aprobado únicamente en combinación con citarabina a bajas dosis <sup>125</sup>.

#### 1.6.4. COMBINACIONES FARMACOLÓGICAS

La administración de fármacos para el tratamiento de la LMA en monoterapia ya sea quimioterapia, terapias no intensivas o fármacos diana – específicos, no ha mostrado la mayor efectividad posible, puesto que la generación de resistencias sigue siendo el fallo principal de estos tratamientos.

Entre las estrategias terapéuticas para combatir o retrasar la aparición de resistencias farmacológicas se encuentra la combinación de inhibidores diana - específicos con quimioterapia <sup>126</sup>, o con otros fármacos dirigidos <sup>127–131</sup>. Para ello, es necesario detectar cuál es la combinación idónea en cada caso, que permita optimizar las respuestas con la mínima toxicidad asociada <sup>6</sup>.

Además, también se ha estudiado el uso de inhibidores específicos duales que inhiban FLT3 y otras dianas como CDK4, JAK2, Mer, Pim y MEK <sup>4,132</sup>, aunque de momento no han resultado muy exitosos.

Recientemente, la empleabilidad de combinaciones triples de fármacos para el tratamiento de la LMA se está investigando por varios grupos. Hoy en día, existen distintos ensayos clínicos que valoran el uso de combinaciones triples, en especial con el inhibidor de Bcl-2, venetoclax.

Algunos ejemplos son la combinación de venetoclax con azacitidina y gilteritinib en pacientes refractarios o en recaída que porten mutaciones en *FLT3* (NCT04140487), o la combinación de venetoclax, con azacitidina y pevonedistat (inhibidor de NEDD8) para pacientes no elegibles para el tratamiento con quimioterapia intensiva (NCT04266795).

A lo largo de esta introducción se ha hecho énfasis en la explicación de aquellos mecanismos moleculares implicados en la enfermedad y los fármacos que pueden ser necesarios para la comprensión del desarrollo de este trabajo. Sin embargo, la inmensidad de los tratamientos y combinaciones farmacológicas que están en investigación para los enfermos de leucemia mieloide aguda es abrumadora.

Tal es así, que actualmente existen decenas de ensayos clínicos disponibles en los que están reclutando pacientes en los distintos hospitales de España, cifra que asciende a 600 ensayos clínicos si se hace referencia a los datos a nivel mundial. Para consultar la información referente a los ensayos clínicos mencionados a lo largo de este trabajo consulte el anexo 1.

## **1.7. RESISTENCIAS FARMACOLÓGICAS**

La mayor dificultad para la curación de la enfermedad continúa siendo la aparición de resistencias farmacológicas, ya sean en modo de refractariedad o recaída <sup>12</sup>. Estas resistencias son las principales responsables de la mortalidad asociada a la enfermedad, que supera incluso a la muerte relacionada con la toxicidad del tratamiento<sup>119</sup>.

Los datos muestran que la refractariedad o recaída ocurren en el 50 % de los pacientes menores de 60 años, y el 80 – 90 % de los pacientes mayores de 60 años <sup>133</sup>, y de ellos, sólo el 10 % se cura <sup>82</sup>.

### **1.7.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA FARMACOLÓGICA**

Debido a la naturaleza heterogénea de la enfermedad, ya de por sí, al diagnóstico, los mecanismos de resistencia generados no se espera que sean homogéneos.

Entre los mecanismos de resistencia farmacológica descritos para la LMA se contempla la adquisición de mutaciones concretas en ciertos genes <sup>134,135</sup>, alteraciones en vías de expresión <sup>47</sup>, o en vías de metabolismo <sup>84,136</sup>. Y, también destacan los estudios que relacionan las resistencias farmacológicas con la plasticidad característica de las células madre hematopoyéticas <sup>137</sup>.

Por una parte, los estudios de secuenciación de exoma completo han puesto en evidencia una evolución clonal característica durante la generación de las resistencias en la enfermedad.

Algunos sub-clones con mutaciones concretas presentes al diagnóstico, podrían mostrar resistencia farmacológica primaria y expandirse. Mientras que también se han descrito situaciones que evidencian la adquisición de mutaciones secundarias durante el tratamiento que permiten escapar al efecto farmacológico.

En general, ambas situaciones podrían coexistir en una misma LMA, demostrando una red mutacional de interacciones sofisticadas que promueven la resistencia farmacológica <sup>133,138</sup>.

Por otra parte, como sucede en otros tumores, en LMA también se han vinculado ciertas alteraciones en el proceso de corte y empalme del ARN mensajero como causa o consecuencia del desarrollo de la resistencia farmacológica <sup>47,139</sup>. Al igual que se han descrito diversas alteraciones en vías de internalización y metabolización de fármacos<sup>136</sup>, como es la sobre-expresión de transportadores de fármacos o las alteraciones en enzimas detoxificadoras <sup>84,133</sup>.

Y aunque algunos de los mecanismos de resistencia provienen de mutaciones genéticas o una expresión aberrante de proteínas, otra gran parte de ellos derivan de funciones inherentes de las HSC <sup>137</sup>.

Así, se ha descrito la activación de las vías de proliferación celular y supervivencia Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR, STAT5/PIM <sup>133,140,141</sup> o GSK-3 $\beta$  <sup>142</sup>, la expresión de proteínas anti-apoptóticas (BCL-2), la activación de vías de auto-renovación (TGF- $\beta$ , *Hedgehog*, Wnt/ $\beta$ -catenina) o mayor capacidad de reparación del ADN como mecanismos de resistencia farmacológica en LMA <sup>84</sup>.

Asimismo, las HSC se conservan en quiescencia durante la ausencia de estímulos específicos del microambiente, por lo que, las LSC podrían mantenerse en dicha situación aun cuando se recibe un tratamiento farmacológico para protegerse frente a lesiones tóxicas <sup>84</sup>.

Además, con la aprobación de nuevos tratamientos para la LMA, se han dado a conocer nuevos mecanismos de resistencia hasta el momento desconocidos <sup>133</sup>.

A continuación, se detallan los mecanismos de resistencia farmacológica más relevantes que se han descrito para la citarabina y para los inhibidores tirosina quinasa.

### 1.7.1.1. Mecanismos de resistencia farmacológica a citarabina

Aunque los regímenes de quimioterapia en primera línea presentan beneficios, un porcentaje significativo de los pacientes fallecen como resultado de la refractariedad al tratamiento o recaída tras la respuesta al mismo.

A nivel mutacional, se ha descrito que la presencia de mutaciones en *TP53*, vinculadas a inestabilidad genómica y cariotipo complejo, representa un grupo particularmente propenso a mostrar quimiorresistencia <sup>143</sup>. Esto mismo ocurre con la presencia de mutaciones en *FLT3* de tipo ITD, las cuales promueven la resistencia a citarabina a través de la señalización intracelular mediada por *RUNX3* <sup>144</sup>. Otros autores relacionan un tipo concreto de mutaciones en *KMT2C* asociadas a pérdida de función de la proteína como un posible marcador de resistencia primaria a citarabina en pacientes pediátricos de LMA <sup>145</sup>. Por otro lado, también se han descrito mutaciones en algunos componentes del espliceosoma (*SRSF2*, *SF3B1* o *U2AF1*) que se han asociado con resistencia a quimioterapia en LMA secundaria <sup>23,44</sup>.

En cuanto a alteraciones en la expresión, algunos autores evidencian el papel de ciertos ARNs no codificantes de cadena larga (lncRNAs) en la resistencia farmacológica a citarabina, describiendo su implicación en los mecanismos de corte y empalme del ARN mensajero o epigenéticos <sup>146</sup>. Por ejemplo, el grupo de Hu N. y colaboradores <sup>147</sup>, describe la sobre-expresión del lncRNA *MALAT1* en LMA y demuestra que el silenciamiento de *MALAT1* re-sensibiliza los modelos celulares de LMA a citarabina, promoviendo la apoptosis e inhibición de la proliferación celular mediada por el fármaco.

Además, durante la resistencia a citarabina en LMA, la expresión aberrante de ciertas proteínas de la maquinaria del espliceosoma podría traducirse en un mal ensamblaje de algunos ARNs mensajeros con la subsecuente expresión de proteínas con funciones alteradas que contribuyan al proceso de leucemogénesis <sup>47</sup>. Un ejemplo de ello, serían las alteraciones observadas en la expresión de la quinasa activadora de citarabina en la célula, la desoxicitidina quinasa (DCK), por alteraciones en el corte y empalme de su ARN precursor <sup>148</sup>.

Respecto a alteraciones metabólicas, siguiendo la línea previamente explicada, se han descrito alteraciones en *DCK* en cultivos resistentes a citarabina <sup>149</sup>, donde observan que al silenciar el gen *in vitro* aumenta la resistencia farmacológica a citarabina. Otros experimentos con muestras *ex vivo* llevados a cabo por el grupo de Ajay Abraham y colaboradores <sup>92</sup>, ponen de manifiesto la presencia de diferencias en los niveles de expresión de *DCK* y otros genes involucrados en el metabolismo de citarabina atendiendo a la sensibilidad *ex vivo* que mostraron al fármaco 260 muestras de

pacientes de LMA. Así detallan la disminución de los niveles de expresión de la quinasa activadora de citarabina, desoxicitina quinasa, *DCK*, o del transportador de nucleósidos equilibrador (*ENT1*), mientras que evidencian un aumento en la expresión de la desaminasa inactivadora de citarabina, citidina desaminasa (*CDA*), en las muestras *ex vivo* resistentes al fármaco <sup>92</sup>.

Estudios adicionales a estos, han demostrado que algunos polimorfismos presentes en las moléculas que intervienen en el metabolismo de citarabina influyen en la respuesta farmacológica que presentan a ésta 225 pacientes con LMA de nuevo diagnóstico tras el tratamiento de inducción <sup>150</sup>. En concreto, describen que las variantes alélicas *DCK* rs2306744 y *CDA* rs602950 están asociadas con el alcance de remisiones completas<sup>150</sup>.

Además de los estudios previamente expuestos, algunos autores vinculan la resistencia a citarabina con sobre-expresión de bombas de expulsión multifármacos que permiten disminuir el efecto farmacológico de la quimioterapia como los transportadores de resistencia multifármaco (MDR) de la familia ABC <sup>133</sup>.

Por último, como se ha comentado previamente, la protección característica de las LSCs o la ofrecida por el microambiente tumoral también se han descrito como posibles mecanismos de resistencia farmacológica a citarabina.

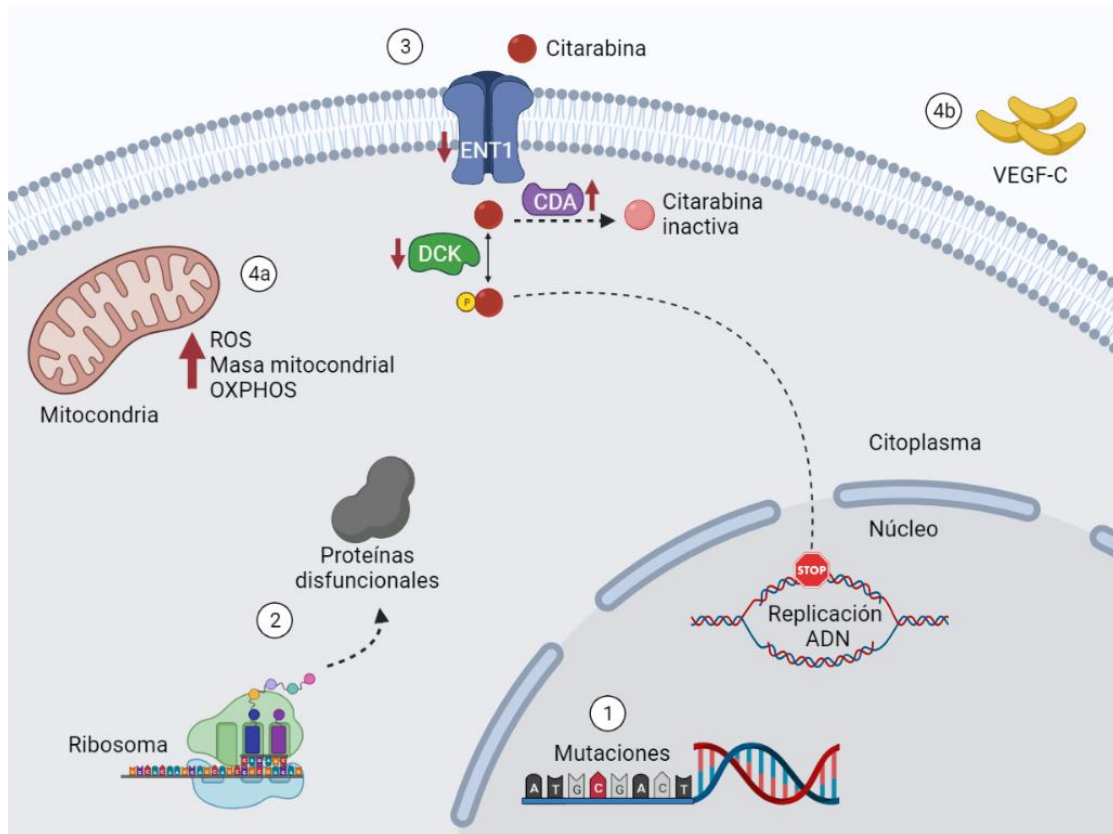
En este sentido, se conoce que en la LMA los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) son bastante elevados debido al arresto en la maduración, pero que éstos se compensan con sistemas antioxidantes robustos que protegen a las células leucémicas de la muerte celular inducida por el estrés oxidativo <sup>151</sup>. Los fármacos quimioterapéuticos actúan además en parte, aumentando el estrés oxidativo celular. De modo que la disrupción de estas vías de señalización confiere cualidades que permiten evadir el efecto farmacológico de la quimioterapia <sup>152</sup>. Al contrario que las HSCs, las LSCs son capaces de reducir la generación de ROS, y, además, presentan mayor tolerancia a su presencia. Por ello, se ha descrito que las células resistentes a citarabina, aunque presentan niveles altos de especies reactivas de oxígeno, se compensa el efecto de éstas con mayor masa mitocondrial y mayor actividad OXPHOS <sup>152</sup>. También se han puesto de manifiesto otros mecanismos compensatorios del estrés oxidativo generado por la quimioterapia que favorecen la resistencia a citarabina, como mayor actividad de mieloperoxidasa (MPO) <sup>153</sup>.

Particularmente, el grupo de Aroua N. y colaboradores <sup>154</sup> , sostiene esta hipótesis describiendo el papel de CD39 en la resistencia a citarabina, y relacionando mayor actividad de CD39 con mayor actividad mitocondrial y mayor resistencia farmacológica *in vitro* e *in vivo*.

Además, otro papel importante en las resistencias a citarabina viene desempeñado por el nicho de médula ósea o microambiente tumoral. El nicho contiene distintos tipos de células madre (mesenquimales, endoteliales, de linaje óseo, neuronales, células inmunes y adipocitos), responsables de secretar ciertas citoquinas reguladores de todas las funciones biológicas de las HSCs <sup>155</sup>.

El nicho de médula ósea media la resistencia a quimioterapia con varios mecanismos ya sea mediante la liberación de factores solubles o a través de la regulación de la adhesión celular <sup>155</sup>. Por ejemplo, el factor C de crecimiento endotelial vascular (VEGF-C) protege a los blastos de sufrir apoptosis inducida por la quimioterapia <sup>156</sup>. Otro modo de evadir la apoptosis viene desempeñado por el factor de transcripción proteína M1 de la caja *Forkhead* (FOXM1), la cual se une a  $\beta$ -catenina, activando la vía Wnt /  $\beta$ -catenina, estabilizando a la proteína e inhibiendo su degradación <sup>157</sup>. De modo que, preserva la quiescencia de las LSCs y promueve la auto-renovación de éstas <sup>157</sup>.

La figura 11 muestra un resumen de los mecanismos de resistencia descritos.



**Figura 11. Mecanismos moleculares más comunes de resistencia a citarabina.**

(1) Adquisición de mutaciones en ciertos genes diana; (2) generación de proteínas disfuncionales que favorecen la resistencia; (3) alteraciones en proteínas de metabolismo de la citarabina; (4a) alteraciones estrés oxidativo; (4b) señales del microambiente tumoral. Imagen generada con BioRender.

### 1.7.1.2. Mecanismos de resistencia farmacológica a inhibidores tirosina quinasa

A pesar de los resultados aparentemente prometedores obtenidos con los inhibidores de FLT3, todos ellos han fallado en mostrar respuestas eficientes en pacientes de LMA cuando se emplean en monoterapia <sup>70,158</sup>, y o bien no generan respuestas iniciales suficientes, o fallan en mantener los beneficios terapéuticos debido al desarrollo de resistencias secundarias <sup>159-162</sup>.

Al igual que para el tratamiento con citarabina, se han descrito distintos mecanismos de resistencias a los inhibidores de FLT3 <sup>103,119,135,163</sup>. Principalmente se vinculan algunas rutas de evolución clonal que involucran la adquisición de mutaciones en la diana *FLT3* u otros genes. Pero también se exponen la presencia de alteraciones en la expresión de ciertas vías de señalización celular, modificaciones en el metabolismo de los inhibidores o alteraciones en el microambiente tumoral que promueven la protección del tumor en la médula ósea.

El mecanismo más común de resistencia a los inhibidores de FLT3 es la adquisición de mutaciones secundarias que afectan a la proteína diana, que generan alteraciones en otros dominios del gen para los cuales los fármacos no son efectivos, o que intervienen estructuralmente con la unión al fármaco.

Cabe recordar que las mutaciones en el TKD de *FLT3* mantienen una conformación activa del dominio quinasa constante, mientras que las mutaciones en el JMD alteran la capacidad de autoinhibición del receptor, por lo que, estas últimas permiten encontrar al receptor en su conformación quinasa activa o inactiva.

Los inhibidores de FLT3 de tipo I afectan al receptor cuando el dominio tirosina quinasa se encuentra en su conformación activa, por lo que, en general, son eficaces frente a las mutaciones presentes en el TKD y en el JMD. Mientras que los inhibidores de tipo II sólo actúan frente a la quinasa en su conformación inactiva, y, por tanto, únicamente son eficaces ante la presencia de mutaciones en el JMD <sup>134</sup>.

Por ello, la adquisición de mutaciones secundarias en el TKD de *FLT3* es uno de los mecanismos más racionales y comunes de resistencia a los inhibidores de FLT3 de tipo II <sup>103,134,135,164</sup>. Un ejemplo claro son las mutaciones que afectan al residuo D835 (TKD2) <sup>87,165</sup>, o al residuo Y842 (TKD2) <sup>9</sup>, que confieren resistencia a los inhibidores de tipo II, sorafenib y quizartinib, pero no a los de tipo I midostaurina y gilteritinib.

Sin embargo, algunas mutaciones en el TKD no sólo generan resistencia a los inhibidores de tipo II, sino que también se han descrito como posibles mecanismos de resistencia a los inhibidores de tipo I.

Por ejemplo, la mutación F691L (localizada en el TKD1), confiere resistencia a sorafenib y quizartinib, al igual que a gilteritinib y midostaurina <sup>9,87,103,166</sup>, posiblemente porque modifican estructuralmente el sitio de unión de dichos inhibidores al receptor.

Otro ejemplo de ello es la mutación N676K (localizada en el TKD1), que se ha vinculado con la resistencia a midostaurina en monoterapia <sup>105</sup>.

No obstante, las mutaciones en el TKD solo ocurren en un 3 – 60 % de los pacientes que recaen tras el tratamiento con inhibidores de FLT3, y estos porcentajes son menores cuando se emplean inhibidores más novedosos como gilteritinib <sup>135</sup>.

Además, dada la gran diversidad de mutaciones de tipo ITD, la localización y secuencia de aminoácidos de estas mutaciones puede contribuir a la resistencia farmacológica, a través de la generación de una conformación proteica que lidere la activación de rutas de señalización alternativas.

Por ejemplo, la variante *FLT3-ITD627E* (TKD1) confiere resistencia primaria a midostaurina y se caracteriza por la sobre-expresión independiente de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 <sup>69</sup>.

Incluso, no sólo se ha descrito la adquisición de mutaciones en el gen *FLT3*, sino también la pérdida de éstas como un posible mecanismo de resistencia farmacológica<sup>167</sup>.

Por otro lado, algunos autores identifican la presencia de mutaciones en otros genes que no son dianas directas, que activan vías de señalización paralelas o subyacentes al receptor, las cuales alteran la señalización de rutas de supervivencia celular <sup>119,163</sup>.

Por ejemplo, se ha descrito la selección clonal de mutaciones en la vía RAS/MAPK (*NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *CBL* y *BRAF*) como un mecanismo de resistencia a gilteritinib <sup>111,165,167</sup>, o la presencia de mutaciones co-existentes o adquiridas en *JAK1*, *JAK2* o *JAK3* que podrían conferir resistencia clínica a sorafenib, midostaurina o quizartinib en un 4,4 % de los pacientes con mutaciones en *FLT3-ITD* <sup>168</sup>.

También, se ha detallado la activación aberrante de las vías PI3K/mTOR en la resistencia *in vitro* a sorafenib <sup>70</sup>, o Ras/Raf/MEK/ERK <sup>169</sup> en resistencias además de a sorafenib, a midostaurina o gilteritinib, entre otros inhibidores de FLT3 <sup>124,131,132,163,170</sup>.

Por todo ello, es lógico que se haya evaluado la utilidad de combinar inhibidores de FLT3 con inhibidores multidiaria como dasatinib, o inhibidores de JAK <sup>171</sup>, inhibidores de AKT <sup>169</sup>, o inhibidores de ERK <sup>132</sup>.

Sin embargo, en muchos casos no se puede saber si las mutaciones encontradas son mutaciones secundarias al tratamiento farmacológico, o si se trata de la expansión de sub- clones pre-existentes cuya detección al diagnóstico estuviera limitada por la sensibilidad de las técnicas empleadas.

En general, se tiende a creer que los mecanismos de resistencia a inhibidores de tipo II se deben a la adquisición de mutaciones en *FLT3*, mientras que los mecanismos de resistencia a inhibidores de tipo I se explican por la aparición de mutaciones o activación de otras dianas que no son el receptor FLT3 <sup>134</sup>.

Asimismo, las células con mutaciones en *FLT3* pueden adaptarse a la presencia de los inhibidores del receptor y desarrollar mecanismos que evitan el bloqueo de éste. Esos mecanismos podrían ser, por ejemplo, el aumento de la expresión del ligando de FLT3, la sobre-expresión de la quinasa oncogénica *PIM*, o del receptor tirosina quinasa Axl <sup>172</sup>.

La mayoría de los pacientes con mutaciones en *FLT3* también expresan el gen en su forma salvaje simultáneamente. Como el receptor salvaje es sensible al ligando, el ligando libre activa señales de supervivencia durante la terapia. Esto es especialmente relevante cuando se sobre-expresa el ligando como mecanismo compensatorio de la falta de actividad del receptor <sup>173</sup>.

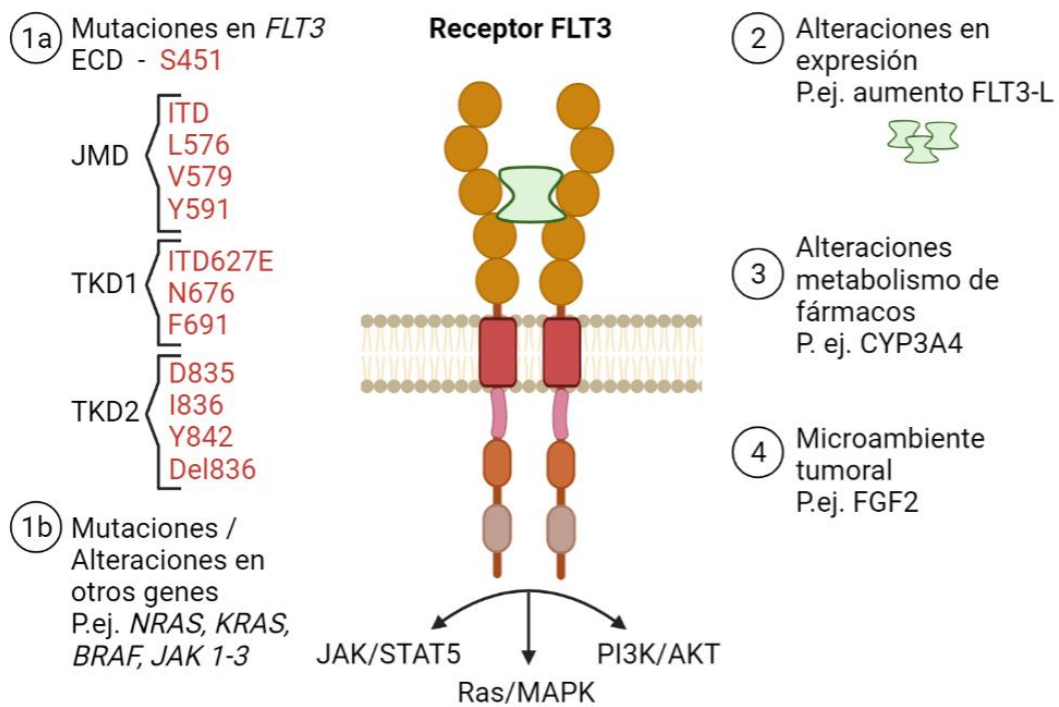
Por otro lado, la sobre-expresión de *PIM* lidera su actividad a través de la activación constitutiva de STAT5, contribuyendo a la resistencia a los inhibidores de FLT3 <sup>174</sup>. Por tanto, dirigir los tratamientos a STAT5 o PIM, en combinación con los inhibidores de FLT3, representa una estrategia racional para evadir estas resistencias <sup>175</sup>. Además, su sobre-expresión se ha vinculado con el aumento de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL, mostrando en consecuencia el escape de la apoptosis <sup>176</sup>.

De manera similar, la activación de Axl puede contribuir a la resistencia a los inhibidores de FLT3 a través de la activación de las vías RAS/MAPK y PI3K/AKT/mTOR <sup>110,177</sup>.

Por otro lado, también se han descrito algunas alteraciones en el metabolismo de estos inhibidores en relación con el microambiente tumoral de médula ósea. En concreto, la alta expresión del citocromo CYP3A4 en las células estromales presentes en el nicho celular de la médula ósea puede ayudar a reducir los niveles de los inhibidores de FLT3 efectivos en el nicho, y, por tanto, contribuir a la resistencia farmacológica a TKI <sup>178</sup>.

En último lugar, se ha vinculado la protección del microambiente de médula ósea en las resistencias a los inhibidores de FLT3 <sup>103</sup>. Por ejemplo, la liberación del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) por parte de las células estromales, induce resistencia farmacológica activando al receptor FGFR1 e induciendo su señalización a través de la vía MAPK <sup>179</sup>.

Como resumen de este apartado consulte la figura 12.



**Figura 12. Mecanismos moleculares más comunes de resistencia a los TKI.**

(1a) Desarrollo de mutaciones en FLT3 u (1b) otros genes; (2) alteraciones en expresión; (3) alteraciones en el metabolismo de fármacos; (4) microambiente tumoral. Adaptado desde Staudt D. y colaboradores <sup>9</sup>. Imagen generada con BioRender.

## **1.8. MEDICINA PERSONALIZADA: LA PERSPECTIVA FUTURA DE LA LMA**

Como se ha ido describiendo, la leucemia mieloide aguda es una enfermedad hematológica altamente agresiva con una heterogeneidad compleja a nivel génico y biológico. El desarrollo de terapias más eficientes debería mejorarse a la par que incrementa el conocimiento de la naturaleza heterogénea y sub-clonal de la enfermedad, especialmente en el estudio de células remanentes quimiorresistentes, que sirven como un reservorio importante de enfermedad que puede provocar la recaída tras una respuesta inicial a la terapia <sup>1</sup>.

Sin embargo, con la implementación de nuevos tratamientos en la clínica se han ido describiendo nuevos mecanismos de resistencia por el momento desconocidos, y es que la gran plasticidad que muestran las células blásticas convierte a la enfermedad en un ente más complejo aun si cabe.

A este respecto, la medicina personalizada se convierte en la única opción posible para dirigir los tratamientos a las rutas de supervivencia que estén alteradas en cada caso y en cada individuo concreto. En los últimos años se ha ahondado pronunciadamente en el conocimiento de las bases biológicas de la enfermedad, lo que ha permitido refinar la estratificación de riesgo de los pacientes, con la incorporación de guías que permiten adaptar las opciones terapéuticas de manera más precisa <sup>1</sup>, pero esto aún puede mejorarse.

Esta personalización del tratamiento ha de ir de la mano de una continua mejora de la estratificación de riesgo de los pacientes, que permita discernir claramente entre aquellos que puedan beneficiarse o no de un tratamiento concreto en el momento del diagnóstico de la enfermedad <sup>92</sup>, o incluso si han mostrado resistencia <sup>180</sup>, permitiendo mejorar las respuestas farmacológicas <sup>133</sup>.

Finalmente, para superar la enfermedad tendremos que disponer de un amplio abanico de opciones terapéuticas disponibles y aprobadas clínicamente, como el uso de combinaciones farmacológicas, que posiblemente resulten de gran utilidad, no sólo para evitar el desarrollo de resistencias, sino también para superarlas en el caso de que éstas aparezcan.



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## 2.1. HIPÓTESIS

▪ Las **hipótesis** propuestas en este trabajo son las siguientes:

1. Los tratamientos actuales empleados en la rutina clínica para la leucemia mieloide aguda, como los esquemas de citarabina o los inhibidores diana-específicos tirosina quinasa, generan respuestas insuficientes que no se prolongan en el tiempo. Este fallo en la efectividad de las terapias vigentes está asociado a la presencia de alteraciones genéticas, transcriptómicas y proteómicas en determinados mecanismos moleculares o rutas de señalización celular.
2. Los modelos *in vitro* e *in vivo* de la patología son aproximaciones esenciales para el estudio de las alteraciones moleculares y la evaluación de la respuesta a los distintos tratamientos empleados para la LMA. Asimismo, el empleo de muestras *ex vivo* de pacientes con LMA permitirá validar la implicación de los mecanismos de resistencia detectados, a la vez que evaluar distintas estrategias terapéuticas de manera fiable y en un periodo de tiempo estrecho. En definitiva, la aplicación de los distintos modelos disponibles, o generados, creará un escenario perfecto para los estudios de validación funcional.
3. El estudio de las modificaciones implicadas en el fallo de los tratamientos en las muestras de diagnóstico y resistencia farmacológica de los pacientes con LMA permitirá identificar nuevos biomarcadores de respuesta a los tratamientos empleados en cada caso. El hallazgo de nuevos biomarcadores vinculados a la efectividad de los distintos tratamientos disponibles garantizará en la práctica clínica, una mejora en la estratificación de la respuesta farmacológica de los pacientes, proporcionando herramientas que ayuden a discernir entre aquellos que puedan beneficiarse de unas terapias y no de otras.
4. El fallo de los tratamientos disponibles supone la causa principal de muerte asociada a la enfermedad. Así, la identificación de los mecanismos responsables de las resistencias farmacológicas en la patología permitirá detectar nuevas dianas terapéuticas sujetas a distintas estrategias farmacológicas aún no exploradas. Los abordajes farmacológicos que se propongan ampliarán la disponibilidad de distintas opciones terapéuticas, suponiendo una mejora notable en el tratamiento de la enfermedad.

## 2.2. OBJETIVOS

Los **objetivos** propuestos para esta tesis son los siguientes:

1. Caracterizar los mecanismos moleculares implicados en la LMA y la respuesta farmacológica a los esquemas de quimioterapia basados en citarabina o a los tratamientos diana-específicos basados en la inhibición del receptor FLT3, mediante el empleo, cuando sea posible, de muestras pareadas.
2. Validar la implicación funcional de las alteraciones moleculares detectadas en la resistencia farmacológica a los tratamientos a estudiar mediante el empleo de muestras *ex vivo* de pacientes con LMA, y modelos *in vitro* de la enfermedad que representen las situaciones de sensibilidad y resistencia farmacológica.
3. Proponer nuevos biomarcadores moleculares de respuesta a los tratamientos objeto de estudio que puedan aplicarse en la práctica clínica.
4. Evaluar nuevas estrategias farmacológicas en modelos *in vitro* para el tratamiento de la LMA en base a los mecanismos de resistencia identificados.
5. Explorar la eficacia y seguridad de las combinaciones farmacológicas más prometedoras en modelos *ex vivo* e *in vivo* de la enfermedad.

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS



### 3.1. SELECCIÓN DE MUESTRAS DE PACIENTES Y DONANTES SANOS

Los datos demográficos de los grupos de pacientes con LMA, NMP y SMD seleccionados y donantes sanos cuyas muestras fueron empleadas para este trabajo se presentan a continuación en la tabla 4. Las características principales de cada individuo, así como la relación de técnicas para las cuales se han utilizado sus muestras, están resumidas en el anexo 2.

	LMA (78)	NMP (12)	SMD (11)	Donantes (21)
Género femenino	37 (47 %)	4 (33 %)	3 (27 %)	11 (52 %)
Género masculino	41 (53 %)	8 (67 %)	8 (73 %)	10 (48 %)
Edad general	58 (1 – 84)	73 (44 – 88)	72 (42 – 88)	55 (28 – 82)
Edad femenino	57 (1 – 84)	71 (44 – 83)	68 (42 – 84)	59 (28 – 80)
Edad masculino	59 (4 – 81)	74 (53 – 88)	74 (59 – 88)	50 (33 – 82)
FAB M0	2	-	-	-
FAB M1	26	-	-	-
FAB M2	14	-	-	-
FAB M4	8	-	-	-
FAB M5	16	-	-	-
FAB M6	2	-	-	-
LMA-s	6	-	-	-
LMA-t	4	-	-	-
Diagnóstico	77	12	11	-
Refractariedad	19	-	-	-
Recaída	15	-	-	-

**Tabla 4. Datos demográficos de los grupos de pacientes con LMA, NMP y SMD seleccionados y donantes sanos cuyas muestras han sido empleadas.**

Se detallan del total de pacientes, el número de pacientes por género (femenino o masculino (%)), edad general o por género (media y rango), la clasificación de la enfermedad (FAB, LMA-s o LMA-t) y el momento de toma de las muestras (diagnóstico, refractariedad o recaída). -, no aplica.

Todos los pacientes y donantes sanos firmaron un consentimiento informado tras haber comprendido el mismo, de acuerdo con las directrices recogidas en la Declaración de Helsinki, Convenio del Consejo de Europa relativo a derechos humanos y biomedicina, Declaración Universal de la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) sobre el genoma humano y derechos humanos y requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

El conjunto de todos los estudios que involucraban muestras de pacientes o donantes sanos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Instituto de Investigación Biomédica del Hospital 12 de Octubre.

### **3.1.1. MUESTRAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Para los estudios de transcriptómica o secuenciación de ARN (RNA-seq), se seleccionaron retrospectivamente todos los pacientes diagnosticados de LMA no M3 en el Hospital 12 de Octubre desde el año 1999 hasta el año 2019, que hubieran sido tratados con citarabina y dispusieran de muestras de ARN de manera pareada.

Se escogieron 25 pacientes (pacientes 2 – 17, 33, 62, 63, 65, 71 – 75), con disponibilidad de muestras de ARN de médula ósea completa al diagnóstico y tras la evaluación de la respuesta al tratamiento con citarabina.

De esta selección, se emplearon muestras de ARN para el estudio de los niveles de expresión de los genes codificantes de las proteínas SR, *SRRM2* y *SRSF12*. Se usaron muestras de ARN de células CD34+ de médula ósea de 15 – 14 donantes sanos (D1 – D15), y muestra de ARN de médula ósea completa de 12 – 11 pacientes de NMP (pacientes N1 – N12), 11 pacientes de SMD (pacientes S1 – S11) y 16 pacientes de LMA (pacientes 1 – 16), todos al diagnóstico, haciendo un total de 54 o 52 muestras respectivamente para los estudios de expresión de *SRRM2* o *SRSF12*.

Además, se emplearon muestras pareadas de ARN de 7 de los pacientes de LMA seleccionados para los estudios transcriptómicos (pacientes 10 – 15 y 17), y que, por tanto, mostraron resistencia farmacológica al tratamiento con citarabina, para el estudio de expresión de *SRRM2*.

### 3.1.2. MUESTRAS DE PROTEÍNAS

En cuanto a los estudios fosfoproteómicos, se seleccionaron 3 pacientes con LMA (pacientes 10, 18 y 19) con disponibilidad de pellet proteico de células mononucleadas de médula ósea (BMMC) de manera pareada al diagnóstico y tras presentar resistencia al tratamiento con citarabina.

Mientras que, para el estudio de los mecanismos de resistencia a TKI, se emplearon muestras de un paciente (paciente 76) también con disponibilidad de pellet proteico de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) de manera pareada al diagnóstico y tras el desarrollo de resistencia a TKI (sorafenib).

Además, 3 muestras de PBMC de este mismo paciente (paciente 76) se usaron para evaluar los niveles de la proteína ERK1/2 fosforilada mediante electrotransferencia.

Para los estudios de expresión proteica de las proteínas SR fosforiladas mediante técnicas inmunohistoquímicas, se seleccionaron de manera retrospectiva, de todos los pacientes diagnosticados de LMA no M3 entre los años 2003 y 2020 tratados con citarabina, aquellos de los que hubiera disponibilidad de muestras de extensión de médula ósea al diagnóstico y cuya respuesta al tratamiento se hubiera evaluado.

El grupo total de estudio consistió en 64 pacientes (respondedores (pacientes 8, 12, 14 – 17, 19 – 21, 24 – 57, n = 43) y no respondedores (pacientes 6, 7, 10, 11, 13, 18, 22, 23, 58 – 70, n = 21)), 7 de los cuales disponían, además, de la muestra de evaluación de la respuesta presentada al tratamiento (refractoriedad (pacientes 7, 22 y 23, n=3) o recaída (pacientes 16, 17, 20 y 21, n=4)).

Para estudiar los niveles de expresión de las proteínas SR se utilizaron las muestras pareadas de los 4 pacientes de LMA al diagnóstico y en la recaída tras el tratamiento con citarabina.

Por otro lado, para el estudio de los niveles de expresión proteica de fosfo-ERK1/2 mediante inmunohistoquímica, se emplearon muestras pareadas de coágulo de médula ósea embebido en parafina de 2 pacientes de LMA al diagnóstico y tras el desarrollo de resistencia al tratamiento con TKI (sorafenib (paciente 3) o midostaurina (paciente 12)).

### 3.1.3. CÉLULAS PRIMARIAS

Para la evaluación de los tratamientos farmacológicos más interesantes a nivel clínico se emplearon células mononucleadas de médula ósea. Para el estudio del tratamiento en monoterapia o en combinación de H3B-8800 junto con venetoclax, se utilizaron muestras de 3 pacientes de LMA al diagnóstico con disponibilidad de células congeladas en viabilidad (pacientes 38, 43 y 68). Mientras que para la evaluación de los fármacos midostaurina, trametinib o su combinación se emplearon muestras en fresco de médula ósea de 5 pacientes de LMA en distintas etapas de evolución de la enfermedad (pacientes 17, 38, 39, 77 y 78).

Por último, los estudios de toxicidad farmacológica se realizaron con células progenitoras mieloides CD34+ de médula ósea procedentes de 3 donantes sanos (D16) o controles reactivos (linfomas no infiltrantes, D17 y D18) para la evaluación de H3B-8800 y venetoclax en monoterapia y su combinación. Mientras que, para la evaluación de los fármacos midostaurina y trametinib y su combinación, se emplearon muestras de 3 donantes sanos (D19 – D21).

## 3.2. FÁRMACOS

Los fármacos citarabina (ref. S1648), glasdegib (ref. S7160), madrasin (ref. S0280), midostaurina (ref. S8064), sorafenib (ref. S7397), SPHINX31 (ref. S8810), trametinib (ref. S2673) y venetoclax (ref. S8048) se obtuvieron en la casa comercial Selleck Chemicals (Houston, EE. UU.). SRPKIN-1 (ref. HY-116856) se adquirió en la casa comercial MedChemExpress (Monmouth Junction, EE. UU.).

Por otro lado, el fármaco azacitidina fue suministrado por el Departamento de Farmacia del Hospital 12 de Octubre (Madrid, España), mientras que, los fármacos H3B-8800 y decitabina fueron proporcionados por la empresa Vivia Biotech (Madrid, España).

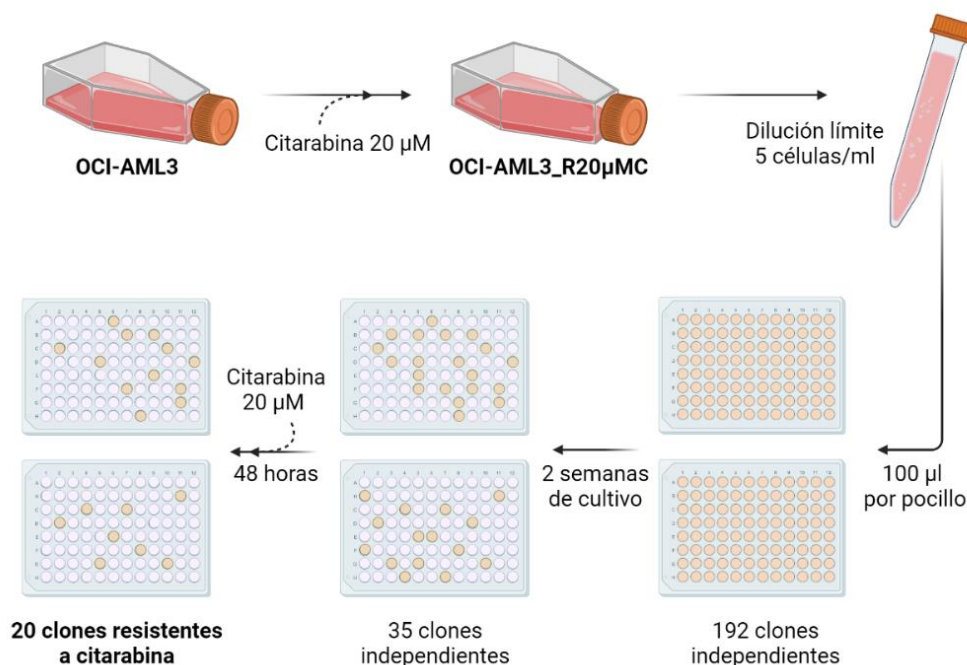
Las soluciones stock de citarabina, azacitidina y decitabina se disolvieron en tampón fosfato salino, PBS (ref. BE17-516F, Lonza, Walkersville, EE. UU.). Por el contrario, las soluciones stock para el resto de los fármacos se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) (ref. D2650, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.), y todas ellas se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización. Las diluciones posteriores se desarrollaron en el medio de cultivo correspondiente para obtener las concentraciones finales para el cultivo de las líneas o la realización de otros experimentos.

### 3.3. CULTIVOS CELULARES Y GENERACIÓN DE MODELOS DE RESISTENCIA

Las líneas celulares humanas modelo de leucemia mieloide aguda MOLM-13, OCI-AML3 y SKM-1 se obtuvieron de la casa comercial *DSMZ culture collection* (Braunschweig, Alemania). Sin embargo, la línea THP-1 fue proporcionada por la empresa Viviva Biotech.

Las líneas celulares farmacológicamente resistentes MOLM-13\_R20nMS, OCI-AML3\_R5 $\mu$ MM y OCI-AML3\_R20 $\mu$ MC, fueron generadas desde sus parentales MOLM-13 u OCI-AML3 tras la exposición mantenida a dosis crecientes de los fármacos sorafenib, midostaurina y citarabina respectivamente.

Por otro lado, el aislamiento de distintos clones resistentes de la línea celular OCI-AML3\_R20 $\mu$ MC se llevó a cabo mediante una dilución celular límite (5 células por ml) hasta completar un total de 192 cultivos celulares individuales de 100  $\mu$ l. Tras dos semanas de mantenimiento de los clones en ausencia de citarabina, se obtuvieron 35 clones independientes desde la línea celular parental OCI-AML3\_R20 $\mu$ MC. Posteriormente, los 35 clones fueron expuestos al fármaco a concentración de 20  $\mu$ M durante 48 horas recolectándose un total de 20 clones independientes modelos de resistencia farmacológica a citarabina (observe la figura 13).



**Figura 13. Esquema de aislamiento de distintos clones de OCI-AML3\_R20 $\mu$ MC, modelos de resistencia a citarabina.**

Imagen generada con BioRender.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI-1640 (ref. BE12-702F/U1, Lonza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (ref. SV30160.03, Cytiva, Marlborough, EE. UU.) y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina, ref. DE17-602E, Lonza).

El medio de cultivo celular para las líneas celulares farmacológicamente resistentes se suplementó con los fármacos sorafenib a 20 nM, midostaurina a 5 µM o citarabina a 20 µM respectivamente. Las líneas celulares se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda que contenía el 5% de CO<sub>2</sub>, y se realizaron subcultivos cada 2 – 3 días de manera periódica.

Para estudiar las variantes en el material génico de tres réplicas, tanto de las líneas resistentes MOLM-13\_R20nMS y OCI-AML3\_R20µMC, así como de sus parentales MOLM-13 y OCI-AML3, se secuenció el ADN de ellas llevando a cabo el protocolo de secuenciación de ADN detallado más adelante en el apartado “3.7.4. Secuenciación de ADN”.

## **3.4. TÉCNICAS PARA LA EXTRACCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO**

### **3.4.1. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

El ADN y ARN de cultivos celulares y de las muestras de donantes sanos fue extraído mediante el kit *AllPrep DNA/RNA Mini Kit* de Qiagen (ref. 80204, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

En el caso de las muestras de ARN de pacientes de LMA, SMD y NMP, éstas se solicitaron al Servicio de Hematología del Hospital 12 de Octubre, quienes habían llevado a cabo la extracción de ARN con el reactivo trizol (ref. TR118, Molecular Research Center, Cincinnati, EE. UU.) siguiendo los protocolos clínicos estándares establecidos.

### 3.4.2. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Por otro lado, la extracción de proteínas se realizó haciendo uso de un tampón de lisis en frío (consulte la tabla 5) a una densidad de 5 millones de células por ml de tampón de lisis.

Para facilitar la actuación de éste, la suspensión celular se agitó en vórtex cada 5 minutos durante un total de media hora, y finalmente, se centrifugaron las muestras a 14000xg durante 5 minutos para extraer el contenido proteico (sobrenadante).

Reactivo	Concentración	Referencia / Casa Comercial
Tris-HCl pH 8	50 mM	T6066 / Sigma-Aldrich
NaCl	150 mM	S3014 / Sigma-Aldrich
Tritón	1 %	X100 / Sigma-Aldrich
Deoxicolato	0,5 %	D6750 / Sigma-Aldrich
Dodecilsulfato sódico (SDS)	0,1 %	L3771 / Sigma-Aldrich
Inhibidores de proteasas	1X	04693124001 / Roche, Sigma-Aldrich
Inhibidores de fosfatasas	1X	04906837001 / Roche, Sigma-Aldrich
DNAsa 1	1000 U/ml	EN0521 / Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE. UU.)
Agua destilada	-	B230531 / Fresenius Kabi (Bad Homburg, Alemania)

**Tabla 5. Componentes del tampón de lisis frío.**

Se especifican las concentraciones y las referencias de los reactivos empleados para la extracción de proteínas.

### **3.5. TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN**

#### **3.5.1. TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

La cuantificación de muestras de ADN se realizó mediante lecturas en duplicado de cada muestra en el equipo *Qubit® 4.0 Fluorometer*, empleando los reactivos de los kits *Qubit® dsDNA BR Assay Kit* (ref. Q32853, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) o *Qubit® dsDNA HS Assay Kit* (ref. Q32854, Invitrogen) y escogiendo como concentración final la media de las dos lecturas. En su lugar, la cuantificación de muestras de ARN se llevó a cabo en el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific).

#### **3.5.2. TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

Respecto a la cuantificación de proteínas, la concentración de éstas se determinó usando los reactivos *Quick Start™ Bradford 1X Dye Reagent* (ref. 500-0205, Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE. UU.), o *Micro BCA™ Protein Assay Kit* (ref. 23235, Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante y recogiendo la señal de absorbancia a 595 nm o a 562 nm respectivamente. Se cuantificaron triplicados de cada muestra, usando el lector de placas Epoch (BioTek, Colmar, Francia) y con la ayuda del programa Gen5. Ambos protocolos funcionan mediante la extrapolación de la señal de absorbancia recogida respecto a una recta patrón generada con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA, ref. A2153, Sigma-Aldrich).

### **3.6. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS MUESTRAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

La calidad de las muestras de ARN de pacientes de LMA empleadas para estudiar su perfil transcriptómico por RNA-seq, se determinó con el equipo *Bioanalyzer 2100* (ref. G2939B, Agilent Technologies, Las Rozas, España), empleando los reactivos del kit *Agilent RNA 6000 Pico* (ref. 5067-1513, Agilent Technologies) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Atendiendo al perfil de integridad de las muestras de ARN se realizaron variantes en el protocolo de generación de librerías de ARN (contemplado más adelante en el apartado “3.7.5. Secuenciación de ARN”).

Por otro lado, la calidad de las librerías de ADN o ARN generadas se analizó con los reactivos del kit *Agilent DNA 1000 Reagents* (ref. 5067-1504, Agilent Technologies) o *High Sensitivity DNA Reagents* (ref. 5067-4626, Agilent Technologies), empleando el equipo *Bioanalyzer 2100*.

## 3.7. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 3.7.1. EXPRESIÓN DE ARN EN BASES DE DATOS PÚBLICAS

La expresión de los genes codificantes de las proteínas SR (listadas en el anexo 3) en pacientes de LMA y muestras control se estudió gracias a la herramienta GEPIA2 (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis*)<sup>181</sup>. Esta herramienta dispone de los datos públicos sobre la expresión génica de médula ósea de 173 pacientes de LMA (provenientes del proyecto TCGA-LAML<sup>22</sup>) y 70 muestras control de médula ósea (provenientes del proyecto GTEX (*Genotype-Tissue Expression*)<sup>182</sup>).

Asimismo, se analizaron los niveles de expresión de los genes codificantes de las proteínas SR en muestras de médula ósea al diagnóstico de pacientes con LMA *de novo* que respondieron a la terapia (n = 63) o progresaron en la enfermedad (n = 72) tras recibir el tratamiento estándar basado en esquemas de citarabina. Este análisis se realizó empleando los datos públicos del proyecto TCGA-LAML, que fueron divididos por tipo de respuesta al tratamiento, y la herramienta *cBioPortal for Cancer Genomics* desarrollada por el *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*<sup>183</sup>.

### 3.7.2. GENERACIÓN DE ADN COPIA MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPTASA REVERSA (RT-PCR)

La reacción de la transcriptasa inversa para la síntesis de la primera cadena de ADN copia (ADNc), se llevó a cabo desde el ARN mensajero (ARNm) usando el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (ref. 4374967, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), que contiene una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), cebadores aleatorios, transcriptasa reversa, inhibidores de ARNasa y tampón de reacción.

En cada caso se emplearon 500 ng de ARN manteniendo así el ratio 1:1 de mezcla de reacción de la transcriptasa con el ARN de partida.

El programa empleado en el equipo termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (ref.4375786, Thermo Fisher Scientific) fue: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C y tiempo infinito a 4°C.

### 3.7.3. EXPRESIÓN DE ARN POR PCR CUANTITATIVA (PCRQ)

La cuantificación de los niveles de expresión génica de *SRRM2* (identificador único del ensayo: qHsaCED0046512), *SRSF12* (identificador único del ensayo: qHsaCED0045641, ambos de Bio-Rad Laboratories) y del gen *β-glucuronidasa* (ref. 4304970, Thermo Fisher Scientific) como control, se realizó usando la mezcla *TaqMan Gene Expression Master Mix* (ref. 4369016, Thermo Fisher Scientific) y la sonda *SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain* (ref. S7563, Thermo Fisher Scientific).

Los datos de expresión se normalizaron respecto a la expresión del grupo control. En particular, para los estudios pareados de expresión de *SRRM2*, posteriormente, se realizó la comparativa de expresión de manera pareada entre el diagnóstico y la respuesta al tratamiento con citarabina.

Los ensayos de amplificación se llevaron a cabo en placas multipocillo en un volumen final de 10  $\mu$ l. La reacción se inició al añadir 2  $\mu$ l del ADNc obtenido tras el proceso de RT-PCR, y se desarrolló en el equipo *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Instrument (96-Well 0.1 ml Block)* (ref. A28133, Applied Biosystems) durante 40 ciclos en un programa de dos pasos: desnaturalización (95°C, 15 segundos) e hibridación (60°C, 1 minuto) tras una incubación inicial a 95°C durante 10 minutos, necesaria para la activación de la polimerasa.

Las muestras se ensayaron por triplicado, y la cuantificación de los niveles de expresión génica de *SRRM2* y *SRSF12* se realizó con los valores de umbral del ciclo o *cycle threshold* (Ct) empleando el método comparativo de  $\Delta\Delta$ Ct descrito por Livak K.J. y Schmittgen T.D.<sup>184</sup>, usando en todos los casos como control interno el gen de expresión constitutiva *β-glucuronidasa*.

### 3.7.4. SECUENCIACIÓN DE ADN

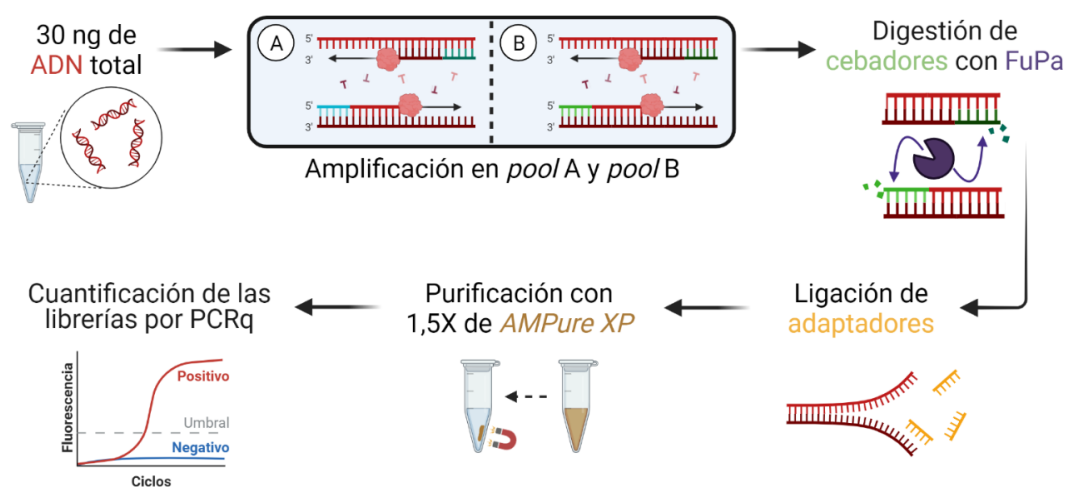
Las variantes en el material génico en los modelos de resistencia farmacológica generados, MOLM-13\_R20nMS y OCI-AML3\_R20 $\mu$ MC, en comparación a sus parentales MOLM-13 y OCI-AML3, se estudiaron haciendo uso del panel mieloide para secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés *next generation sequencing*) empleado de rutina en el Hospital 12 de Octubre, que incluye 42 genes recurrentemente mutados en enfermedades mieloides como la LMA o el SMD (listados en el anexo 4).

### 3.7.4.1. Procedimiento

La preparación de las librerías se realizó siguiendo el protocolo *Ion AmpliSeq™ Library Preparation* con los reactivos del kit *Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0–96 LV* (ref. 4480441, Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific) (véase la figura 14).

El protocolo partió de una cantidad inicial de 30 ng de ADN, y comenzó con una primera PCR donde se amplificaron las muestras de manera separada en dos *pools* con parejas de cebadores customizados *forward* y *reverse* cada uno (*pool A* y *pool B*). Las muestras amplificadas en *pools* diferentes se unieron y sometieron seguidamente a una reacción de digestión con la enzima FuPa, que permitió eliminar los cebadores unidos al ADN amplificado evitando el enmascaramiento de mutaciones en los lugares de hibridación de los cebadores, y posterior a ello, a una reacción de ligación de los adaptadores *Ion Xpress™ Barcode Adapters* (1-16 (ref. 4471250), 17-32 (ref. 4474009), 33-48 (ref. 4474518), 49-64 (ref. 4474519), 65-80 (ref. 4474520) y 81-96 (ref. 4474521)) de Ion Torrent con la enzima ADN ligasa.

Finalizado este paso, se procedió a la purificación del producto con una relación de 1,5X de bolas magnéticas *AMPure XP* (ref. A63881, Beckman Coulter, Life Sciences, Barcelona, España). Así, las librerías de ADN generadas se cuantificaron mediante PCR cuantitativa en el equipo *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Instrument (96-Well 0.1 ml Block)* (ref. A28133, Applied Biosystems) con los reactivos del kit *QIAseq Library Quant Assay Kit* (ref. 333314, Qiagen), que permitieron la cuantificación de las librerías mediante la extrapolación del Ct de las muestras respecto al Ct de las muestras estándar de concentración conocida (5,84 pM, 0,584 pM, 0,0584 pM y 0,00584 pM).



**Figura 14. Esquema de flujo de trabajo para la secuenciación del ADN.**

Imagen generada con BioRender.

Una vez cuantificadas las librerías generadas, se diluyeron a 50 pM y se secuenciaron en el equipo *ION OneTouch2 System* (ref. 4474779, Thermo Fisher Scientific), recogiendo dos millones de lecturas para cada muestra.

Los programas de temperatura y tiempo de las diferentes reacciones del protocolo desarrolladas en el equipo termociclador *2720 Thermal Cycler* (ref. 4359659, Applied Biosystems) o el equipo *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Instrument (96-Well 0.1 ml Block)* (ref. A28133, Applied Biosystems) para cada paso quedan reflejados a continuación en la tabla 6.

Reacción	Ciclos	Condiciones
PCR inicial	1	99°C / 2 minutos
	16	99°C / 15 segundos
		60°C / 4 minutos
	1	10°C / ∞
Digestión	1	50°C / 10 minutos
	1	55°C / 10 minutos
		60°C / 20 minutos
	1	10°C / ∞
Ligación de adaptadores	1	22°C / 30 minutos
	1	72°C / 10 minutos
	1	10°C / ∞
PCR cuantitativa	1	50°C / 2 minutos
	1	95°C / 10 minutos
	30	95°C / 15 segundos
		60°C / 1 minuto

**Tabla 6. Descripción de programas empleados para los experimentos de secuenciación de ADN.**

Se especifican los ciclos y condiciones de temperatura y tiempo para cada paso del protocolo de secuenciación de ADN.

### 3.7.4.2. Análisis de secuenciación de ADN

El análisis de los datos de secuenciación de ADN se realizó empleando la plataforma *Ion Reporter*, y lanzando un flujo de trabajo determinado por el Servicio de Hematología del Hospital 12 de Octubre específico de este panel de secuenciación.

Una vez terminado el análisis, se descargó la relación de variantes encontradas y se filtraron atendiendo a la localización (se escogieron variantes exónicas o localizadas en sitios de splicing), función (se eliminaron variantes descritas como sinónimas), a la frecuencia alélica mínima (MAF) (escogiendo variantes con  $MAF \leq 0,01$  para eliminar polimorfismos), clasificación en ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) (descartando variantes benignas) y cobertura (descartando las variantes con cobertura menor de 100).

Tras ello, se comparó el perfil de cada una de las tres réplicas técnicas, seleccionando así únicamente las variantes detectadas en todas ellas y se visualizaron las variantes encontradas en el programa *Integrative Genomic Viewer* (versión 2.8.12, Broad Institute, University of California) para descartar aquellas que fueran artefactos de secuenciación.

Finalmente, se comparó el perfil de todas las variantes entre los cultivos farmacológicamente resistentes y los parentales para describir las mutaciones adquiridas o perdidas en el proceso de generación de la resistencia a fármacos.

## 3.7.5. SECUENCIACIÓN DE ARN

Para analizar el perfil transcriptómico de muestras pareadas de pacientes con LMA se llevaron a cabo estudios de secuenciación del ARN.

### 3.7.5.1. Procedimiento

La generación de librerías de ARN de muestras pareadas de pacientes de LMA al diagnóstico y tras el tratamiento con citarabina se llevó a cabo siguiendo el protocolo *KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboErase (HMR)* (KR1351 – v1.16) para las plataformas de Illumina (San Diego, EE. UU.), y con el empleo de los reactivos de los kits *KAPA RNA HyperPrep Kit* (ref. 08105952001, Roche) y *KAPA HyperPlus Kit* (ref. 07962380001, Roche).

El flujo de trabajo (véase la figura 15) partió de 10 ng – 1 µg de ARN total, a partir del cual se comenzó con la hibridación de oligonucleótidos y depleción del ARN ribosómico (ARNr) con la enzima *RNAsa H*, y posterior purificación con las *KAPA Pure Beads* (ref. 07983280001, Roche) en una relación de 2,2X.

Posterior a ello, se procedió a la digestión de los oligonucleótidos hibridados con la enzima *DNA*s y una nueva purificación con *KAPA Pure Beads* en relación de 2,2X.

El siguiente paso consistió en la elución del ARN (libre de ARNr), fragmentación por calor, y la generación de la primera cadena de ADNc. Tras ello, se sintetizó la segunda cadena de ADNc, y se realizó la ligación de los adaptadores contenidos en el kit *SeqCap Adapter Kit B* (ref. 07141548001, Roche).

Seguidamente, las muestras se sometieron a una tercera y cuarta purificación con las *KAPA Pure Beads* en relación de 0,63X y 0,7X, y finalmente, las librerías se amplificaron con la polimerasa *HiFi* en una reacción de 11 – 15 ciclos dependiendo de los ng de muestra de partida.

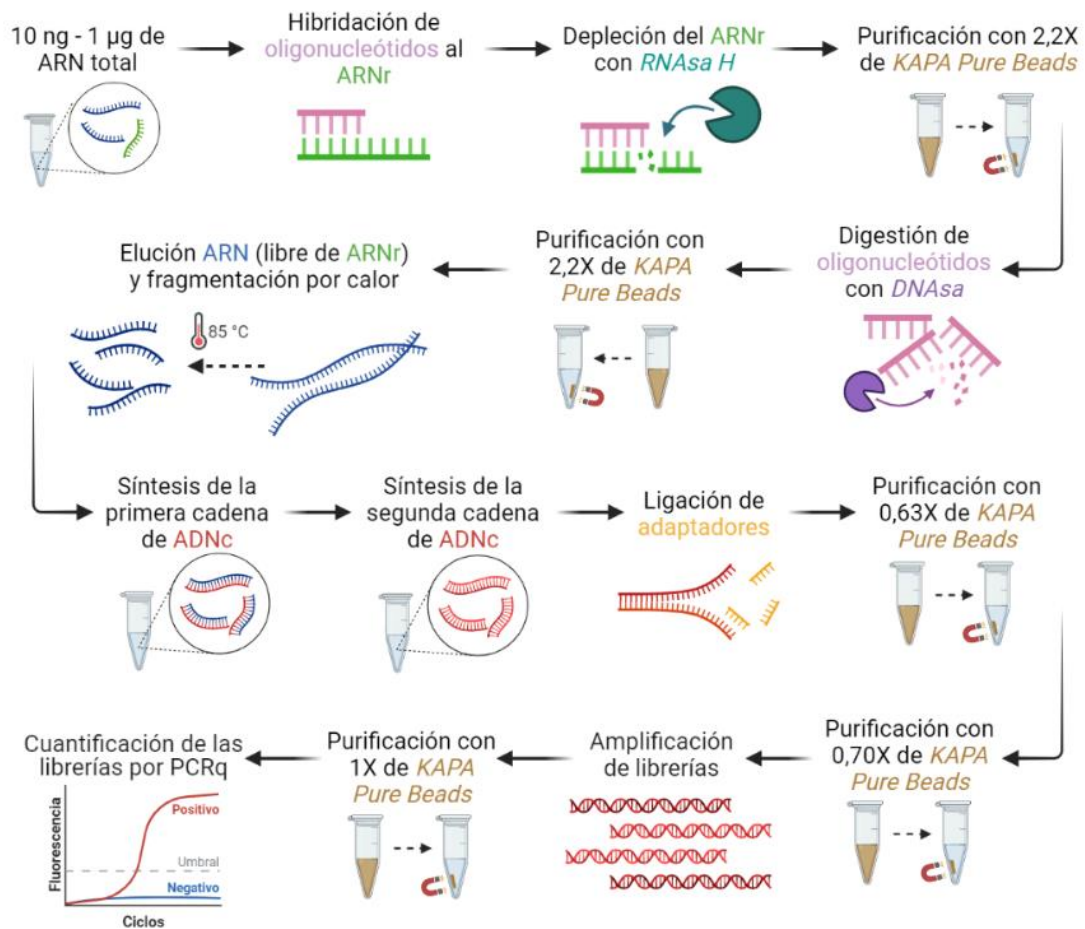
Tras la purificación final de las librerías generadas con las *KAPA Pure Beads* en relación de 1X, se procedió a la cuantificación de éstas usando los reactivos del kit *KAPA Library Quant Kit (Illumina) ROX Low qPCR Mix* (ref. 07960336001, Roche), basada en la comparación del Ct respecto a los Ct de seis estándares de concentraciones conocidas (20 pM, 2 pM, 0,2 pM, 0,02 pM, 0,002 pM y 0,0002 pM).

Como se ha descrito anteriormente en el apartado “3.6. Determinación de la calidad de las muestras de ácidos nucleicos”, se emplearon diferentes variantes del protocolo de generación de librerías de ARN atendiendo a la calidad de las muestras originales.

Se seleccionó la versión A del protocolo de generación de librerías si la muestra de ARN era más íntegra (si la mayoría de ARN estaba en fragmentos de más de 200 pares de bases), mientras que se realizó la versión B del protocolo si la muestra de ARN estaba más fragmentada (si la mayoría de ARN estaba en fragmentos de menos de 200 pares de bases).

El protocolo que se ha descrito correspondería a la versión A, para muestras más conservadas. Sin embargo, la versión B del protocolo, para muestras más fragmentadas, contemplaba un menor tiempo en el paso de fragmentación (véase la tabla 7), menor concentración de adaptadores en el paso de ligación (1,5 µM para la versión A *versus* 0,75 µM para la versión B) y distinta relación de las *KAPA Pure Beads* en la tercera y cuarta purificación (0,63X y 0,7X empleados en la versión A, respecto a 0,8X y 0,9X empleadas en la versión B del protocolo).

Finalizado el proceso de generación de librerías, éstas se diluyeron hasta la concentración de 4 nM. Tras ello, se desnaturalizaron y continuaron diluyeron siguiendo el manual *NextSeq System: Denature and Dilute Libraries Guide* (15048776 v09) hasta la concentración de 1,8 pM y se cargaron 6 – 8 muestras de 3 – 4 pacientes pareados por chip. Las librerías se secuenciaron en los equipos *NextSeq 500/550 System* de Illumina.



**Figura 15. Esquema de flujo de trabajo para la secuenciación del ARN.**

Se muestran los pasos correspondientes a la versión A del protocolo seguido. Imagen generada con BioRender.

Los programas de temperatura y tiempo de las diferentes reacciones del protocolo desarrolladas en el equipo termociclador *ProFlex™ Base* (ref. 4483636, Applied Biosystems) o el equipo *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Instrument (96-Well 0.1 ml Block)* (ref. A28133, Applied Biosystems) para cada paso quedan reflejados a continuación en la tabla 7.

Reacción	Ciclos	Condiciones
Hibridación de oligonucleótidos y depleción de ARNr	1	95°C / 2 minutos
	1	45°C: -0,1°C / segundo
	1	45°C / ∞
	1	45°C / 30 minutos
	1	4°C / ∞
Digestión ADN	1	37°C / 30 minutos
	1	4°C / ∞
Fragmentación	1	Versión A: 85°C / 6 minutos Versión B: 85°C / 3 minutos
Síntesis de la primera cadena de ADNc	1	25°C / 10 minutos
	1	42°C / 15 minutos
	1	70°C / 15 minutos
	1	4°C / ∞
Síntesis de la segunda cadena de ADNc	1	16°C / 30 minutos
	1	62°C / 10 minutos
	1	4°C / ∞
Amplificación de librerías	1	98°C / 45 segundos
	11 - 15	98°C / 15 segundos
		60°C / 30 segundos
		72°C / 30 segundos
	1	72°C / 1 minuto
	1	4°C / ∞
PCR cuantitativa	1	95°C / 5 minutos
	35	95°C / 30 segundos
		60°C / 45 segundos
	1	95°C - 65°C - 95°C

**Tabla 7. Descripción de programas empleados para los experimentos de secuenciación de ARN.**

Se especifican los ciclos y condiciones de temperatura y tiempo para cada paso del protocolo de secuenciación de ARN.

### **3.7.5.2. Análisis de secuenciación de ARN**

Para los análisis de secuenciación de ARN detallados en este trabajo, hemos contado con la ayuda de la empresa Dreamgenics S.L. (Oviedo, España). Dicha empresa realizó un análisis de uso diferencial de exones (DEU, del inglés *differential exons usage*), empleando el paquete de programación *DEXSeq* como una alternativa novedosa al análisis clásico GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*)<sup>185</sup>. Se comparó el perfil de uso de exones de manera pareada (diagnóstico vs resistencia) para cada individuo, representándose gráficamente las alteraciones en el patrón de uso de exones entre ambas condiciones. Con dichos datos, posteriormente, se procedió a la búsqueda dirigida de dianas descritas de las proteínas SR en la literatura<sup>51,54,139,186-191</sup> para evaluar la presencia de alteraciones en el uso de exones de dichas dianas entre ambas condiciones.

## **3.8. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

### **3.8.1. ESTUDIOS DE FOSFO-PROTEÓMICA**

Los experimentos de fosfo-proteómica se realizaron en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid, España).

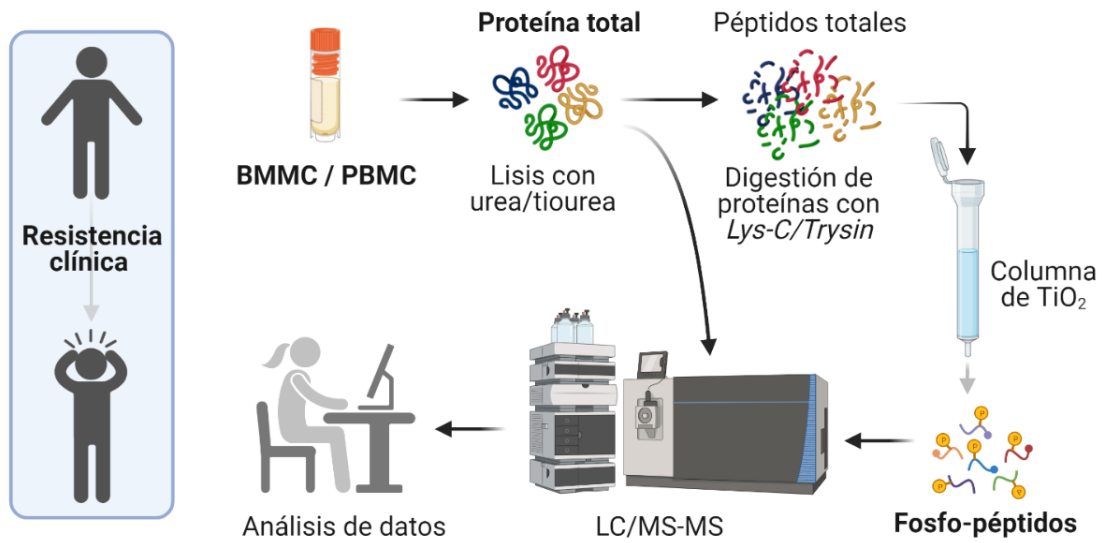
#### **3.8.1.1. Procedimiento**

Para estos experimentos se emplearon células mononucleadas de médula ósea o sangre periférica (consulte la figura 16), las cuales se lisaron con urea y tiourea, siguiendo un método estándar de preparación de la muestra ayudada por filtros. Se cuantificó la concentración proteica de los lisados y se comenzó el protocolo con una cantidad de 250 µg de proteína total.

Las muestras lisadas se digirieron con *Lysyl EndopeptidaseR* (Lys-C) y *Trypsin* hasta obtener péptidos. Después, los fosfo-péptidos, cargados negativamente, fueron enriquecidos al atravesar micro-columnas de TiO<sub>2</sub>, mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC).

El perfil de los fosfo-péptidos enriquecidos y de las proteínas totales se analizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) por duplicados técnicos, usando el espectrómetro de masas *LTQ Orbitrap Velos* (Thermo Fisher Scientific), recogiendo así, una señal de intensidad de cada fosfo-péptido y proteína.

Las plataformas *MaxQuant* y *MaxLFQ* se emplearon para el análisis y cuantificación respectivamente, mientras que los análisis posteriores se realizaron con *Perseus*.



**Figura 16. Esquema de flujo de trabajo para los estudios de fosfo-proteómica.**

Imagen generada con BioRender.

### 3.8.1.2. Análisis de estudios de fosfo-proteómica

Mediante la identificación de los fosfo-péptidos asociados al desarrollo de resistencia farmacológica en los pacientes con LMA, comparando el perfil fosfo-proteómico al diagnóstico y en la resistencia, se pudo identificar las dianas responsables de dichas resistencias, las cuales se validaron mediante técnicas de electrotransferencia e inmunohistoquímica con anticuerpos específicos.

Para el estudio de los mecanismos de resistencia a citarabina empleando datos de fosfoproteómica se realizaron dos enfoques de análisis diferentes. El primero recogió los valores de intensidad de todos los fosfo-péptidos obtenidos en las distintas réplicas técnicas de los tres pacientes estudiados y los comparó en conjunto.

Finalmente, atendiendo al nivel de cambio entre ambas condiciones de análisis (diagnóstico vs resistencia) se detectaron diferencias en el patrón de fosforilación de un gran número de proteínas durante la resistencia farmacológica a citarabina aplicando un nivel de significancia o P valor  $\leq 0,01$ .

El segundo análisis discriminó aquellos fosfo-péptidos cuya señal no se recogió en ambos duplicados técnicos y comparó el patrón de fosforilación entre el diagnóstico y la resistencia farmacológica de manera individual para cada paciente.

Además, en un contexto más restrictivo, únicamente se comparó para cada paciente aquellos fosfo-péptidos cuyo cambio entre ambos momentos o  $\text{Log}_2\text{FC}$  (*fold change*) fuera  $-2 \geq \text{Log}_2\text{FC} \geq 2$ . Finalmente, se identificaron aquellas proteínas cuyos fosfo-péptidos presentaran cambios en todos y cada uno de los tres pacientes.

Para el estudio de los mecanismos de resistencia a TKIs, con la ayuda de la Unidad de Proteómica del CNIO se realizó un análisis GSEA. Este estudio comparó todos los motivos sustrato presentes en ambos momentos (diagnóstico vs resistencia), permitiendo de este modo la identificación de las quinasas responsables de los mismos. Comparando las muestras del paciente a estudio, se identificaron aquellas quinasas responsables de la fosforilación de los motivos sustrato adquiridos en el proceso de resistencia farmacológica. Es decir, aquellas quinasas cuya actividad se hubiera aumentado en la muestra de resistencia farmacológica en comparación con la muestra al diagnóstico.

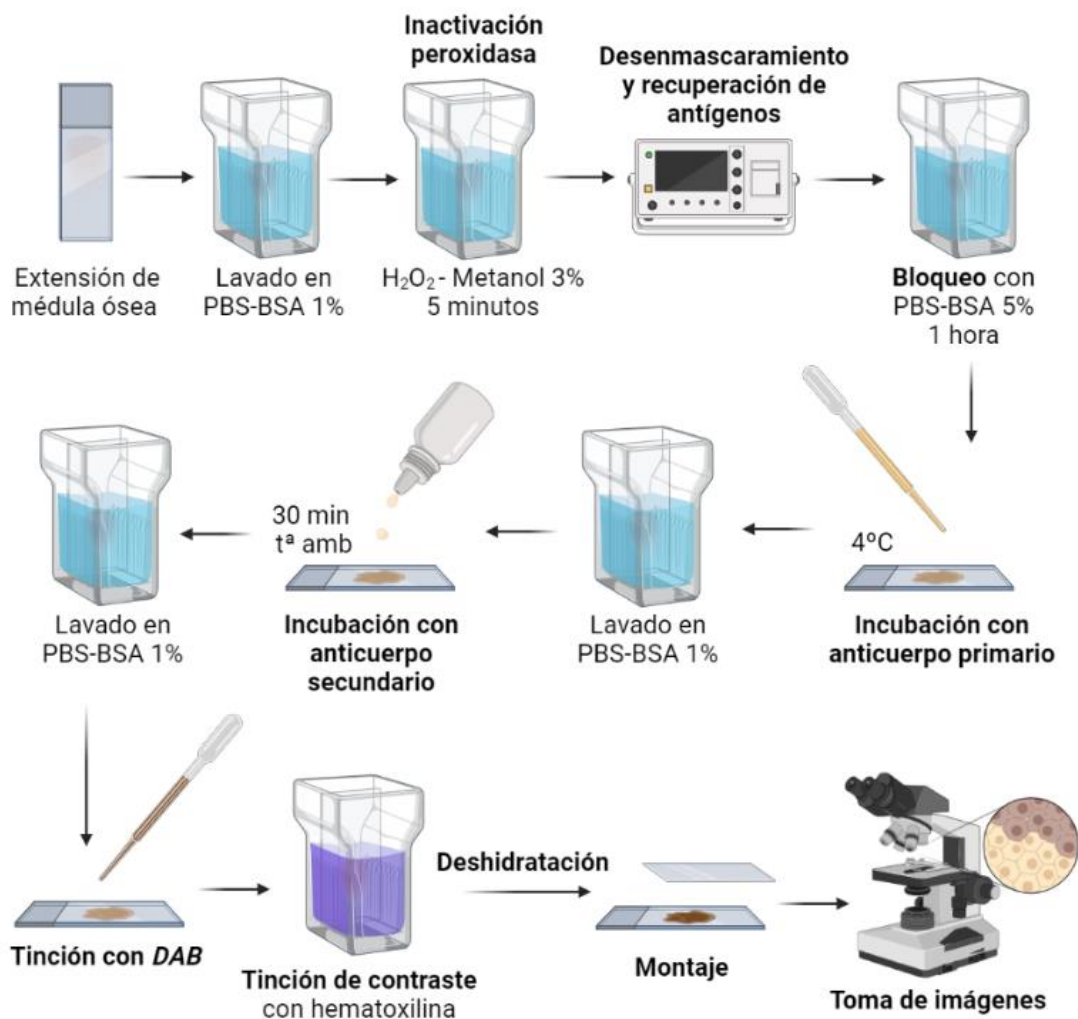
### 3.8.2. HISTOPATOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Para las muestras de extensiones de médula ósea fijadas en metanol (véase la figura 17), los cristales se refrescaron con PBS con 1% de BSA (ref. A2153, Sigma-Aldrich), y la peroxidasa endógena de la muestra se inactivó tras 5 minutos de incubación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ref. 95321, Sigma Aldrich) al 3% en metanol (ref. 67-56-1, Thermo Fisher Scientific). Después, se procedió al desenmascaramiento y recuperación de antígenos mediante inducción por calor en tampón citrato (ácido cítrico 1,8 nM, ref. C1909; citrato de sodio 8.2 nM, ref. W302600, ambos de Sigma-Aldrich). Tras una hora de bloqueo con PBS con 5% de BSA a 4°C para prevenir las uniones inespecíficas, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente preparado en PBS con 1% de BSA a una concentración determinada (véase la tabla 8). Posteriormente, las muestras se lavaron en PBS con 1% de BSA, se incubaron durante 30 minutos con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (consulte la tabla 8), y se lavaron de nuevo para eliminar el anticuerpo secundario no unido.

Finalmente, se usó el reactivo 3,3-diaminobencidina *DAB Substrate kit* (ref. ab94665, Abcam, Cambridge, Reino Unido) para detectar la unión del anticuerpo secundario. Seguidamente, las muestras se sometieron a una tinción de contraste con la solución *Carazzi's hematoxylin* (ref. 255298.1610, PanReac AppliChem, Ottoweg, Alemania) antes de deshidatarlas con concentraciones crecientes de etanol (96% y 100%, ref. 191086.1214, PanReac AppliChem) y xilol (ref. 251769.2711, PanReac AppliChem), y cubrirlas con un cubreobjetos y el medio de montaje *DPX Mountant* para histología (ref. 06522, Sigma-Aldrich).

Las imágenes de las extensiones se tomaron con la cámara digital Leica ICC50 W conectada al microscopio Leica DM 2000 LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) o con la cámara digital Nikon acoplada al microscopio óptico Nikon Eclipse 80i.

La tinción de blastos se cuantificó a partir de varias imágenes tomadas en aumento 40X de campos escogidos al azar. Se cuantificó la señal de un mínimo de 100 – 400 blastos y se calculó la media. Además, esta tinción se clasificó atendiendo a su localización, ya fuera citoplásmica o nuclear.



**Figura 17. Protocolo de inmunohistoquímica.**

Se muestra un esquema del protocolo seguido para las extensiones de médula ósea fijadas en metanol. Temperatura ambiente,  $t^a$  amb. Imagen generada con BioRender.

Las extensiones de coágulo de médula ósea, así como los cortes de médula ósea, bazo, hígado y vejiga urinaria de los animales empleados para los estudios *in vivo*, todos fijados en parafina, siguieron el mismo protocolo descrito previamente, con la única diferencia de un paso inicial añadido de desparafinación. Este paso consistió en la incubación de las muestras con xilol (ref. 251769.2711, PanReac AppliChem) durante 30 minutos, seguida de la rehidratación de las muestras con concentraciones decrecientes de etanol al 100%, etanol al 70%, etanol al 50% y agua destilada durante 5 minutos cada paso.

Anticuerpo	Ref.	Casa Comercial	Origen	Dilución de uso
<i>Anticuerpos primarios</i>				
Anti-Phosphoepitope SR proteins Antibody, clone 1H4	MABE50	Sigma-Aldrich	Ratón	1/150
Anti-SR protein family Antibody, clone 16H3	MABE126	Sigma-Aldrich	Ratón	1/150
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb	4370	Cell Signaling TECHNOLOGY (Leiden, Países Bajos)	Conejo	1/100
CD45 (Intracellular Domain) (D9M8I) XP® Rabbit mAb	13917	Cell Signaling TECHNOLOGY	Conejo	1/100
<i>Anticuerpos secundarios</i>				
SignalStain® Boost IHC Detection Reagent (HRP, Mouse)	8125	Cell Signaling TECHNOLOGY	Cabra	-
SignalStain® Boost IHC Detection Reagent (HRP, Rabbit)	8114	Cell Signaling TECHNOLOGY	Cabra	-
Dako EnVision™ + Dual Link System-HRP	K4063	Agilent	Cabra	-

**Tabla 8. Listado de anticuerpos primarios y secundarios empleados para los estudios de histopatología e inmunohistoquímica.**

Se detalla la referencia (ref.), casa comercial, origen y dilución de uso de los distintos anticuerpos empleados para los estudios de expresión de proteínas mediante histopatología e inmunohistoquímica.

### 3.8.3. ELECTROTRANSFERENCIA

Tras la cuantificación de proteínas de las muestras de pacientes o los cultivos celulares, se separaron 8 µg (para muestras de pacientes), 15 µg o 40 µg (para los cultivos OCI-AML3 o MOLM-13 respectivamente) de proteína mediante electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida (PA, ref. 1610146, Bio-Rad Laboratories) al 10% en condiciones desnaturizantes con SDS (ref. L3771, Sigma-Aldrich), y el tampón de electroforesis *TGS Buffer* (ref. 161-0732, Bio-Rad Laboratories), durante 90 minutos a 120 voltios constantes y con referencia al marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (ref. 161-0394, Bio-Rad Laboratories). Pasado ese tiempo, los geles se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) *Immun-Blot®* (ref. 162-0177, Bio-Rad Laboratories) previamente activadas en metanol, durante 4 horas a 30 voltios y en frío (para las muestras de pacientes y la línea celular MOLM-13), o durante 90 minutos a 400 mAmp y en frío (para la línea celular OCI-AML3) con el tampón de transferencia *TG Buffer* (ref. 161-0734, Bio-Rad Laboratories).

Al finalizar la transferencia, las membranas se tiñeron con *Ponceau S solution* (ref. P7170, Sigma-Aldrich) para comprobar la eficacia de la transferencia. Posteriormente se bloquearon con tampón Tris Salino (ref. 10776834, Thermo Fisher Scientific) – Tween® 20 (Tw, ref. P9416, Sigma-Aldrich) – BSA (ref. A2153, Sigma-Aldrich) (TBS-Tw-BSA) al 3% (peso/volumen) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes preparados en TBS-Tw-BSA al 0,3% (listados en la tabla 9) durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, la membrana se lavó 5 veces con TBS-Tw-BSA al 0,3%, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (tabla 9) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se lavó de nuevo para eliminar el anticuerpo secundario no unido. La unión del anticuerpo secundario se detectó mediante la señal quimioluminiscente con el kit *ECL™ Start Western Blotting Detection Reagent* (ref. GERPN3243) o con el kit *ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent* (ref. GERPN2232) Amersham™, ambos de GE Healthcare (Sigma-Aldrich), mediante el uso del sistema *ChemiDoc™ MP Imaging System* (ref. 12003154; Bio-Rad Laboratories). Las imágenes de estos ensayos se captaron y las densitometrías correspondientes se analizaron con el apoyo del programa ImageLab 5.0 (Bio-Rad Laboratories), normalizando con las bandas de expresión proteica de los respectivos genes de expresión constitutiva. Para la representación de los efectos en la fosforilación de los tratamientos a estudiar, la intensidad de las bandas se normalizó respecto al control de DMSO, y se calculó la relación de intensidad entre la forma fosforilada y la no fosforilada de cada una de las proteínas ensayadas.

Anticuerpo	Ref.	Casa Comercial	Origen	Dilución de uso
<i>Anticuerpos primarios</i>				
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb	4695	Cell Signaling TECHNOLOGY	Conejo	1/1000
Phospho-p44/42 (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) Mouse mAb	9106	Cell Signaling TECHNOLOGY	Ratón	1/2000
Stat5 Antibody	9363	Cell Signaling TECHNOLOGY	Conejo	1/1000
Phospho-Stat5 (Tyr694) (C11C5) Rabbit mAb	9359	Cell Signaling TECHNOLOGY	Conejo	1/100
Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb	4691	Cell Signaling TECHNOLOGY	Conejo	1/1000
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb	4060	Cell Signaling TECHNOLOGY	Conejo	1/2000
p38 MAPK antibody	9212	Cell Signaling TECHNOLOGY	Conejo	1/1000
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (3D7) Rabbit mAb	9215	Cell Signaling TECHNOLOGY	Conejo	1/1000
Anti-alpha Tubulin antibody [DM1A]	AB7291	Abcam	Ratón	1/10000
GAPDH Monoclonal Antibody (6C5)	AM4300	Invitrogen	Ratón	1/10000
<i>Anticuerpos secundarios</i>				
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	7074	Cell Signaling TECHNOLOGY	Cabra	1/2000
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	7076	Cell Signaling TECHNOLOGY	Caballo	1/10000

**Tabla 9. Listado de anticuerpos primarios y secundarios empleados para los estudios de electrotransferencia.**

Se detalla la referencia (ref.), casa comercial, origen y dilución de uso de los distintos anticuerpos empleados para los estudios de expresión de proteínas mediante electrotransferencia.

## 3.9. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS

### 3.9.1. SEPARACIÓN CELULAR DE CÉLULAS RESISTENTES A 48 HORAS

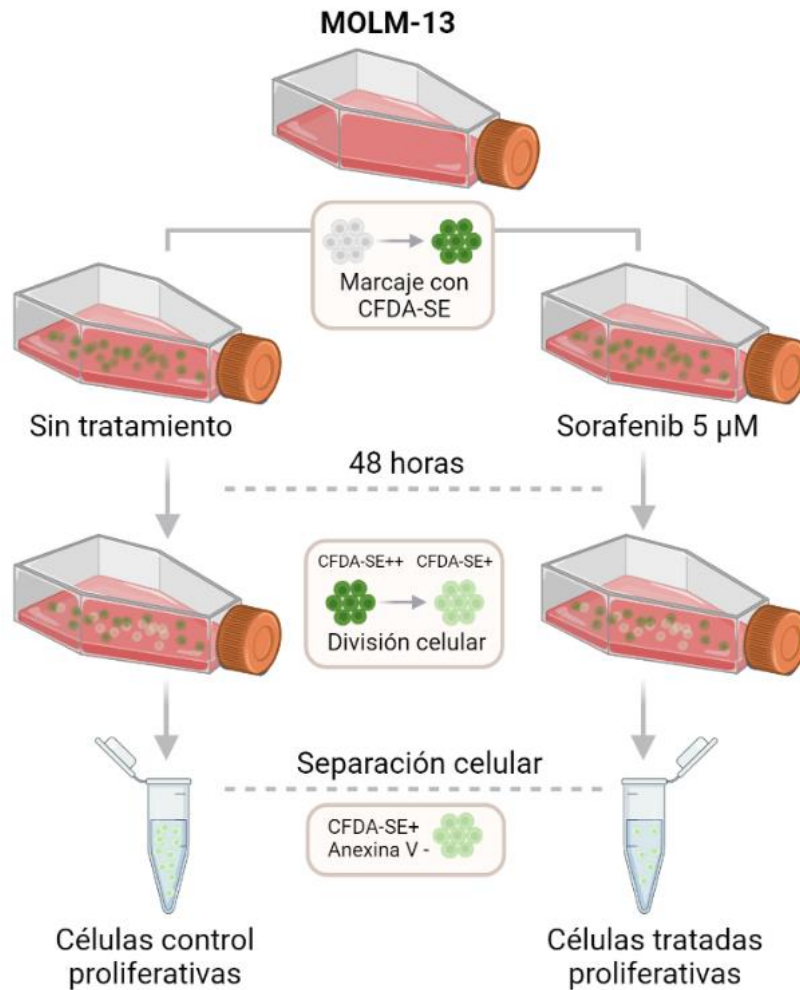
Para los experimentos de enriquecimiento de células resistentes a sorafenib (observe la figura 18), la línea celular farmacológicamente sensible MOLM-13 se tiñó con diacetato de 5-(y-6)-carboxifluoresceína succinimidil éster (CFDA-SE) (ref. 11524217, Thermo Fisher Scientific).

El CFDA-SE es un compuesto fluorescente que permite marcar células vivas de manera estable, uniéndose a ciertos componentes del citoplasma celular por unión covalente. Durante las 24 horas post-tinción se excreta una parte del reactivo, pero tras ello la señal se estabiliza y se va distribuyendo equitativamente con cada división celular, de manera que, permite rastrear el número de divisiones celulares hasta un máximo de 8.

Tras la tinción, las células fueron tratadas con sorafenib 5  $\mu$ M durante 48 horas. Pasado el tiempo de incubación, la tinción con Anexina V-APC (ref. 550474, BD Biosciences, San José, EE. UU.) se empleó para descartar las células muertas, y las células proliferativas y viables (CFDA-SE+, Anexina V-) se seleccionaron con el equipo de citometría *FACS Aria™ Fusion Cell Sorter* (BD Biosciences).

En el caso de los experimentos de células farmacológicamente resistentes, proliferativas y viables realizados con la línea celular OCI-AML3, las células se trataron con midostaurina 25  $\mu$ M, trametinib 5  $\mu$ M o su combinación durante 48 horas tras haber sido teñidas con CFDA-SE.

En ambos casos, se realizaron tres experimentos independientes, se extrajo el contenido proteico (véase el apartado “3.4.2. Técnicas de extracción de proteínas”) y se almacenó a -80°C hasta el estudio proteico posterior.



**Figura 18. Estrategia de trabajo para la separación de células proliferativas viables.**

Se muestran los pasos correspondientes a la separación de células MOLM-13 proliferativas tratadas con sorafenib. Imagen generada con BioRender.

### 3.9.2. PRE-TRATAMIENTO PARA LOS ESTUDIOS DE FOSFORILACIÓN

Las células MOLM-13 y sus derivadas resistentes MOLM-13\_R20nMS, se prepararon en botellas de cultivo independientes a una concentración de  $5 \cdot 10^5$  células por ml con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS y antibióticos. En cada botella se aplicaron diferentes fármacos en monoterapia o en combinación (sorafenib, midostaurina o trametinib) a concentración de 200 nM.

Tras tres horas de incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, cada condición se lavó con tampón fosfato salino frío y se recogió el pellet celular, que fue resuspendido en tampón de lisis frío (ver detalles en la tabla 5) para extraer el contenido proteico.

### 3.9.3. EXPERIMENTOS DE DOSIS-RESPUESTA A FÁRMACOS: TRATAMIENTOS EN MONOTERAPIA Y EN COMBINACIÓN

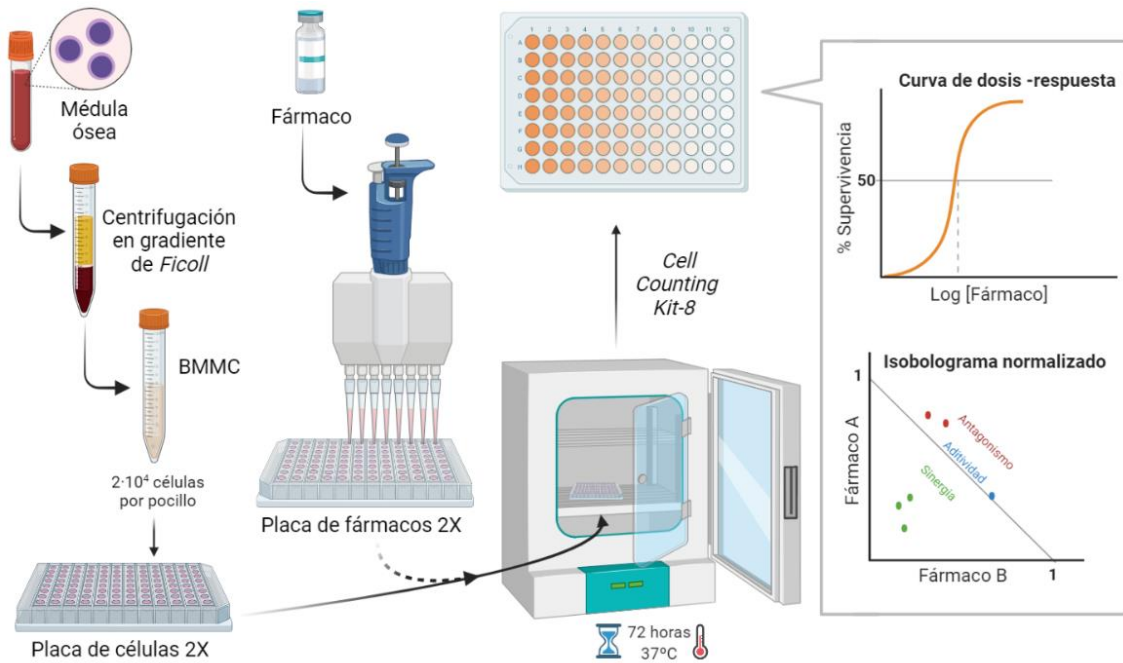
Los estudios de dosis respuesta a fármacos para los experimentos *in vitro* se llevaron a cabo cultivando  $3 \cdot 10^4$  células de las líneas celulares OCI-AML3, SKM-1, THP-1 y OCI-AML3\_R20 $\mu$ MC, o  $2 \cdot 10^4$  células de las líneas MOLM-13 y MOLM-13\_R20nMS por pocillo en placas de 96 pocillos en las condiciones de cultivo descritas en el apartado “3.3. Cultivos celulares y generación de modelos de resistencia”.

Para los experimentos *ex vivo* con muestras de pacientes con LMA en fresco (véase la figura 19), las células mononucleadas de médula ósea se obtuvieron por centrifugación en gradiente de *Ficoll® Paque Plus* (ref. 17144002, Cytiva), posterior lisis de poblaciones eritrocitarias con el reactivo *ACK Lysing Buffer* (ref. A10492-01, Gibco, Thermo Fisher Scientific) y se cultivaron  $2 \cdot 10^4$  células por pocillo con medio StemSpan SFEM (ref. 09650, StemCell Technologies, Grenoble, Francia) conteniendo 20% de FBS, 100 ng/ml de factor *stem cell* humano (SCFh, ref. 130-096-692), 100 ng/ml de ligando FLT3 humano (FLT3-Lh, ref. 130-096-474), 20 ng/ml de interleuquina 3 humana (IL3h, ref. 130-093-908) y 20 ng/ml de interleuquina 6 humana (IL6h, ref. 130-095-365), todas ellas de Miltenyi Biotec S.L. (Pozuelo de Alarcón, España).

Para los experimentos *ex vivo* con muestras congeladas en viabilidad de pacientes con LMA, las células mononucleadas se descongelaron y se cultivaron  $3 \cdot 10^4$  células por pocillo con medio StemSpan SFEM II (ref. 09605, StemCell Technologies) suplementado con el cóctel de citoquinas StemSpan CC100 (ref. 02690, StemCell Technologies).

Las células se expusieron a diferentes concentraciones farmacológicas en monoterapia o en combinación (consultar la tabla 10) hasta alcanzar un volumen final de 100  $\mu$ l por pocillo. En el caso del control, se empleó el mismo porcentaje de vehículo (PBS o DMSO) que el empleado para disolver los fármacos. Finalmente, la viabilidad celular se determinó tras 48 o 72 horas (*in vitro* o *ex vivo*) de exposición a los fármacos o vehículos, usando el reactivo *Cell Counting Kit-8* de Sigma-Aldrich (ref. 96992) en una proporción de 10  $\mu$ l de reactivo por cada 100  $\mu$ l de cultivo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La señal de absorbancia se recogió tras un rango de 30 minutos – 4 horas de incubación con el lector espectrofotométrico *Epoch Microplate Spectrophotometer* (BioTek) y el programa Gen5. Se empleó, entonces, la señal recogida a densidad óptica de 450 nm como referencia, mientras que la señal detectada a la densidad óptica de 620 nm se usó para eliminar el ruido de fondo.



**Figura 19. Protocolo de experimentos de dosis – respuesta a fármacos.**

Se muestran los pasos seguidos para el estudio de dosis – respuesta a fármacos *ex vivo* de muestras de médula ósea en fresco. Imagen generada con BioRender.

Para el análisis de datos de los experimentos de dosis – respuesta en monoterapia, una vez eliminado el ruido de fondo, las medidas recogidas se normalizaron respecto a los pocillos tratados con el vehículo o que mostraron mayor supervivencia, calculando así los porcentajes de supervivencia.

La concentración inhibitoria media máxima o IC50, se calculó a partir de tres experimentos independientes, realizando un ajuste no lineal usando el programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, EE. UU.) y las gráficas de dosis – respuesta se representaron como la media de la supervivencia  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) para cada punto.

Para el análisis de datos de los experimentos de dosis – respuesta en combinación, los índices de combinación (CI) y los isoblogramas normalizados se obtuvieron empleando el programa *Calculusyn* (Biosoft, Cambridge, Reino Unido) o *Compusyn* (Composyn Inc., Paramus, EE. UU.), ambos siguiendo el método descrito por Chou T.C. y Talalay P.<sup>192</sup>.

Muestra	Fármaco	Rango de dosis (De ... hasta ...)	
		Monoterapia	Combinación
<b>Estudio de resistencia a citarabina</b>			
OCI-AML3 SKM-1 THP-1 OCI-AML3_R20μMC	Citarabina	50 μM – 282 pM <sup>A</sup> 16,67 mM – 94 nM	0,62 μM – 22,8 nM <sup>A</sup> 1,85 mM – 68 μM
	H3B-8800	1 mM – 10 fM	100 μM – 10 pM
	Madrasin	50 μM – 24,41 nM	-
	SPHINX31	500 μM – 2,82 nM	-
	SRPKIN-1	500 μM – 2,82 nM	-
	Glasdegib	500 μM – 244 nM	125 μM – 15,63 μM
	Midostaurina	25 μM – 12,8 pM	2 μM – 16 nM
	Venetoclax	1 mM – 20,48 pM	10 μM – 80 nM
	Azacitidina	25 mM – 512 pM	1,6 μM – 12,8 nM
Decitabina	4 mM – 82 pM	0,8 mM – 6,4 μM	
<i>Ex vivo</i>	H3B-8800	10 μM – 0,1 fM	10 μM – 0,1 fM
	Venetoclax	111,11 μM – 14,85 nM	10 μM – 80 nM
<b>Estudio de resistencia a TKI</b>			
MOLM-13 MOLM-13_R20nMS OCI-AML3 OCI-AML3_R5μMM	Sorafenib	<sup>B</sup> 5 μM – 0,26 aM <sup>C</sup> 5 μM – 12,8 pM	<sup>B</sup> 5 nM – 0,05 pM
	Trametinib	<sup>B,C</sup> 5 μM – 2,56 pM <sup>D</sup> 5 μM – 0,16 pM	<sup>B</sup> 20 nM – 2,5 nM <sup>C</sup> 200 nM – 12,8 pM <sup>D</sup> 20 pM – 0,16 pM
	Midostaurina	<sup>B,C</sup> 5 μM – 0,32 nM <sup>D</sup> 25 μM – 8 nM <sup>E</sup> 125 μM – 2,56 pM	<sup>B</sup> 40 nM – 1,25 nM <sup>C</sup> 5 μM – 64 pM <sup>D</sup> 1 μM – 0,32 nM
<i>Ex vivo</i>	Midostaurina	25 μM – 12,8 pM	1 μM – 8 nM
	Trametinib	5 μM – 2,56 pM	5 μM – 2,56 pM

**Tabla 10. Descripción de dosis farmacológicas empleadas para los experimentos *in vitro* y *ex vivo* de dosis-respuesta en monoterapia y en combinación.**

<sup>A</sup>Dosis empleadas para el cultivo OCI-AML3\_R20μMC. <sup>B</sup>Dosis empleadas para el cultivo MOLM-13. <sup>C</sup>Dosis empleadas para el cultivo MOLM-13\_R20nMS. <sup>D</sup>Dosis empleadas para el cultivo OCI-AML3. <sup>E</sup>Dosis empleadas para el cultivo OCI-AML3\_R5μMM.

### 3.9.4. ESTUDIOS DE TOXICIDAD FARMACOLÓGICA

Para testar la toxicidad relacionada con los tratamientos más interesantes a nivel clínico, se emplearon muestras de médula ósea de donantes sanos, se estudiaron los niveles de toxicidad en ellas cultivándolas en un medio de metilcelulosa y realizando el recuento de las colonias generadas. Las células mononucleadas de médula ósea se obtuvieron por centrifugación en gradiente de *Ficoll Paque Plus* (ref. 17144002, Cytiva) y se purificaron las células progenitoras de médula ósea CD34+ con el kit *MACs CD34 MicroBead* (ref. 130-046-703, Miltenyi Biotec S.L.) que se basa en la separación por unión a anticuerpos marcados magnéticamente.

Tras la purificación de las células CD34+,  $2 \cdot 10^3$  células se resuspendieron en 200  $\mu$ l de medio de cultivo IMDM suplementado con 25 mM HEPES (ref. BE12-722F, Lonza) y 20% de FBS. Después, las células se sumergieron en 3,8 ml de metilcelulosa (*Methocult Express*, ref. 4437, StemCell Technologies) con diferentes concentraciones de los fármacos correspondientes (véase la tabla 11) o DMSO como control.

Tras ello, las células sumergidas en la mezcla de metilcelulosa con fármacos se plaquearon en placas de Petri de 35 mm (ref. 351008, Corning, Sao Paulo, Brasil) en triplicados de 1,1 ml y se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> durante 13 – 14 días.

Pasado el periodo de incubación, las unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E) y granulocíticas-monocíticas (UFC-GM) se contabilizaron usando el microscopio Olympus VMZ 1X – 4X (Olympus Iberia S.A.U., Barcelona, España) y se capturaron distintas imágenes con el sistema *ChemiDoc Imaging Systems* (Bio-Rad Laboratories) y con la cámara digital Leica ICC50 W conectada al microscopio Leica DM 2000 LED (Leica Microsystems).

Estudio	Fármaco	Rango de dosis (De ... hasta ...)	
		Monoterapia	Combinación
Resistencia a citarabina	H3B-8800	0,01 $\mu$ M – 0,001 $\mu$ M	0,01 $\mu$ M – 0,001 $\mu$ M
	Venetoclax	2 $\mu$ M – 0,4 $\mu$ M	2 $\mu$ M – 0,4 $\mu$ M
Resistencia a TKI	Midostaurina	2,5 $\mu$ M – 25 nM	0,25 $\mu$ M – 25 nM
	Trametinib	5 $\mu$ M – 5 nM	0,05 $\mu$ M – 5 nM

**Tabla 11. Descripción de dosis farmacológicas empleadas para los experimentos *ex vivo* de toxicidad en monoterapia y en combinación.**

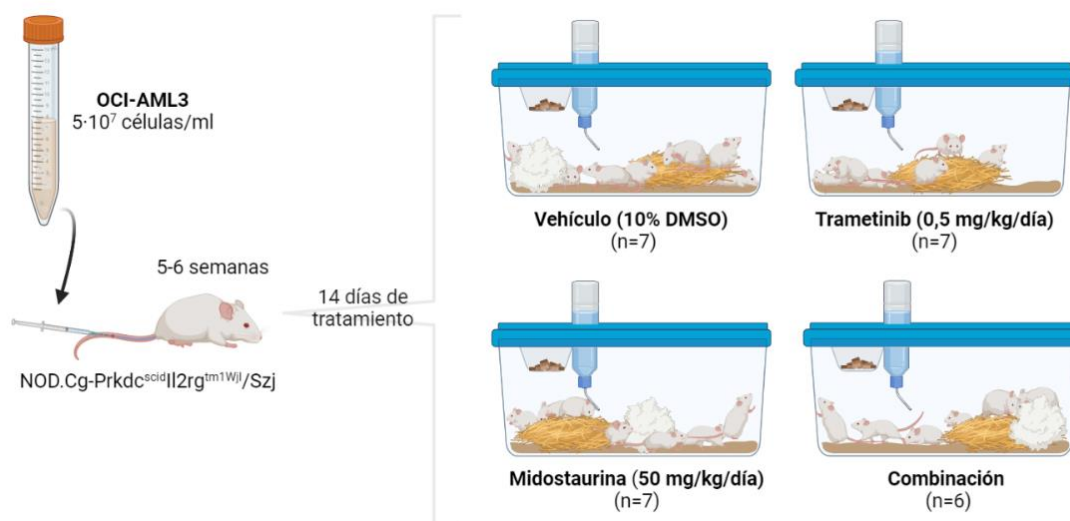
### 3.9.5. ESTUDIOS *IN VIVO*

Para el estudio de la eficacia y seguridad *in vivo* de las combinaciones farmacológicas más interesantes (véase la figura 20) se emplearon ratones inmunodeficientes *Nod scid gamma* (NSG) del *Jackson Laboratory* (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/Szj) (Bar Harbor, EE. UU.) a la edad de 5 – 6 semanas.

Durante el estudio se les proporcionó agua y la dieta estándar para roedores en modo *ad libitum*. Los ratones se mantuvieron en cubetas de 6 – 7 animales, en estantes ventilados en un ambiente libre de patógenos, constituyendo cada cubeta un grupo de tratamiento farmacológico.

Para injertar la enfermedad, se inyectaron  $5 \cdot 10^6$  de células OCI-AML3 resuspendidas en 100  $\mu$ l de PBS mediante inyección intravenosa a través de la cola. Previamente, se llevó a cabo una prueba piloto con 4 animales para comprobar la eficacia del injerto sin necesidad de irradiación o tratamiento mieloablativo, y la selección de la línea celular a emplear (MOLM-13 (n = 2) y OCI-AML3 (n = 2)).

Tres días después de la inyección, los ratones fueron tratados con vehículo (DMSO al 10%, n = 7), trametinib (0,5 mg/kg, n = 7), midostaurina (50 mg/kg, n = 7) o la combinación de ambos (trametinib y midostaurina a las mismas dosis que en monoterapia, n = 6) cada día durante 2 semanas.



**Figura 20. Esquema de estudios *in vivo*.**

Se muestran los distintos grupos de tratamiento a estudio. Imagen generada con BioRender.

Los ratones fueron monitorizados (control de peso, extracción de sangre, signos de anemia, fuerza de agarre) y sacrificados cuando aparecieron signos de enfermedad avanzada o puntos finales humanitarios (pérdida del 10% del peso, cifosis, parálisis, parámetros de dolor, etc...) durante el periodo de 57 días que duró el experimento.

En el momento de la necropsia, se pesaron y midieron el bazo y el hígado de cada animal, para determinar los signos de esplenomegalia o hepatomegalia, y se recogieron los órganos de interés (esternón, bazo, hígado, vejiga urinaria, etc...) para fijarlos en bloques de parafina con el objeto de realizar estudios posteriores.

Los animales de experimentación empleados en este trabajo se estabularon en el Animalario del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas de acuerdo con las Guías Nacionales e Internacionales de Bienestar Animal. Los protocolos para este estudio recibieron su aprobación por el Instituto de Bienestar Animal y por el Comité de la Comunidad de Madrid el 18 de abril de 2017 (PROEX/022/17).

### **3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Cada experimento se realizó al menos por triplicado. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.01 y 6 (GraphPad Software). Las pruebas estadísticas de *Shapiro-Wilk* y *Levene* se aplicaron para evaluar la normalidad y homocedasticidad respectivamente. Las comparaciones entre dos grupos con distribución normal se realizaron usando el *t test* de *Student* paramétrico pareado o no pareado según las condiciones del estudio. Las comparaciones entre dos grupos con distribución no normal se llevaron a cabo empleando la prueba *signed-rank* de *Wilcoxon* para las muestras pareadas, o la prueba de *Mann-Whitney* para las no pareadas. Las comparaciones entre más de dos grupos con distribución no normal se realizaron empleando la prueba de *Kruskal-Wallis*. Las curvas de supervivencia global se analizaron mediante la estimación de *Kaplan-Meier* y la prueba *Mantel-Cox* para la comparación entre los grupos. La tasa de riesgos instantáneos o *hazard ratio* (HR) se empleó para investigar la influencia del tratamiento en la supervivencia global. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor P fue  $\leq 0,05$  (o  $P \leq 0,01$  para los estudios de fosfo-proteómica). Los datos se representaron en cada caso como la media  $\pm$  SEM.



# 4. RESULTADOS



## 4.1. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA FARMACOLÓGICA A ESQUEMAS DE TRATAMIENTO CON CITARABINA

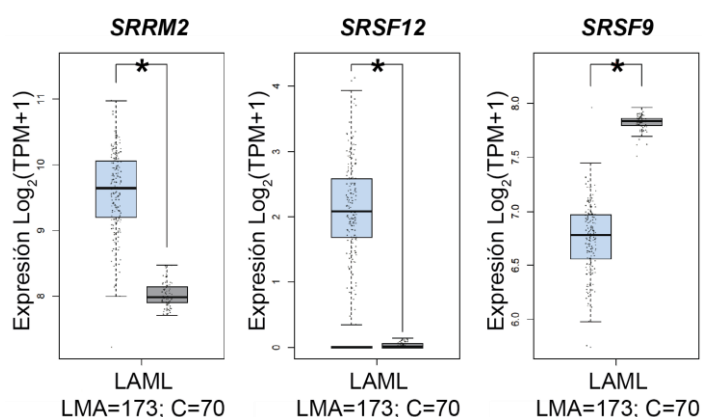
### 4.1.1. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS SR EN PATOLOGÍA MIELOIDE Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON CITARABINA

#### 4.1.1.1. La presencia de alteraciones en la expresión de genes codificantes de proteínas SR fue detectada en patología mieloide pero no se asociaba a la respuesta al tratamiento con citarabina

Los estudios de comparación de tejidos malignos vs tejidos sanos han puesto de manifiesto ciertas diferencias en la expresión de genes de factores que intervienen en *splicing* tanto en enfermedades hematológicas, como en tumores sólidos <sup>59</sup>.

Con el fin de determinar los cambios a nivel de expresión génica de los genes codificantes de las proteínas SR recogidos en el anexo 3, en leucemia mieloide aguda, se empleó la plataforma GEPIA2 <sup>181</sup>.

En dicha plataforma, la comparación de los datos públicos disponibles de los proyectos TCGA-LAML (LMA) y GTEx (tejido sano) permitió detectar la existencia de diferencias significativas en los niveles de expresión de ARN de 3 genes codificantes de proteínas SR (*SRRM2*, *SRSF12* y *SRSF9*) (observe la figura 21). Así, se detectó la sobre-expresión de los genes *SRRM2* y *SRSF12*, y la infra-expresión de *SRSF9* en LMA respecto a muestras control.

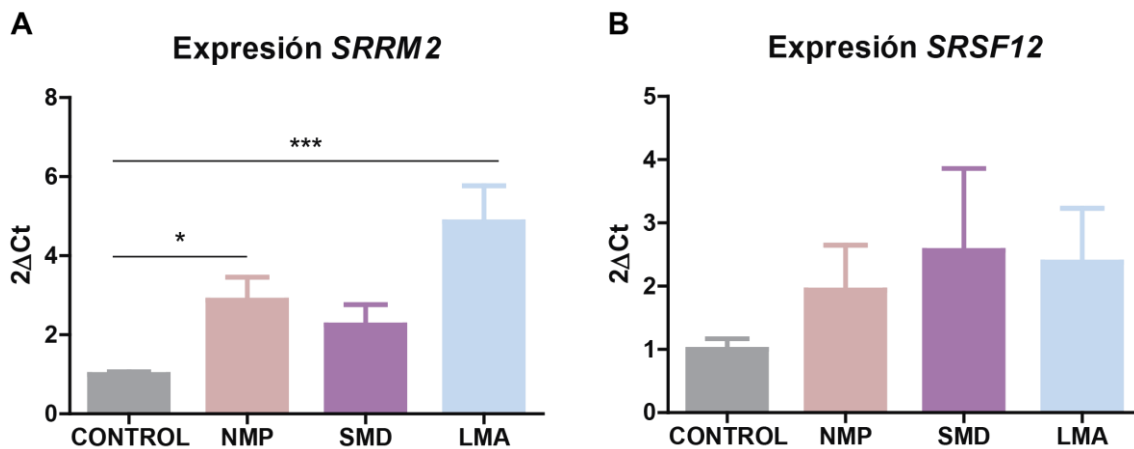


**Figura 21. Los niveles de expresión de *SRRM2*, *SRSF12* y *SRSF9* se mostraron alterados en LMA (en color azul) respecto a muestras control (en color gris).**

Comparación de los niveles de expresión de los genes codificantes de proteínas SR *SRRM2*, *SRSF12* y *SRSF9* disponibles en GEPIA2, procedentes de los proyectos del TCGA-LAML (n = 173) y GTEx (controles (C), n = 70).

La expresión de los genes sobre-expresados, *SRRM2* y *SRSF12*, fue entonces estudiada en una serie propia de muestras de ARN de médula ósea de pacientes con LMA (pacientes 1 – 16) u otras enfermedades mieloides, como la neoplasia mieloproliferativa (NMP, pacientes N1 – N12) o el síndrome mielodisplásico (SMD, pacientes S1 – S11), así como en muestras de médula ósea de donantes sanos (donantes D1 – D15). De este modo, se observó que *SRRM2* estaba sobre-expresado respecto a la expresión del gen en muestras control ( $P = 0,0002$ ). En concreto, estaba sobre-expresado en pacientes con leucemia mieloide aguda y también en pacientes con neoplasias mieloproliferativas ( $n = 54$ ) (gráficas disponibles en la figura 22A), sugiriendo que su sobre-expresión podría jugar un papel en el desarrollo de enfermedades hematológicas de estirpe mieloide.

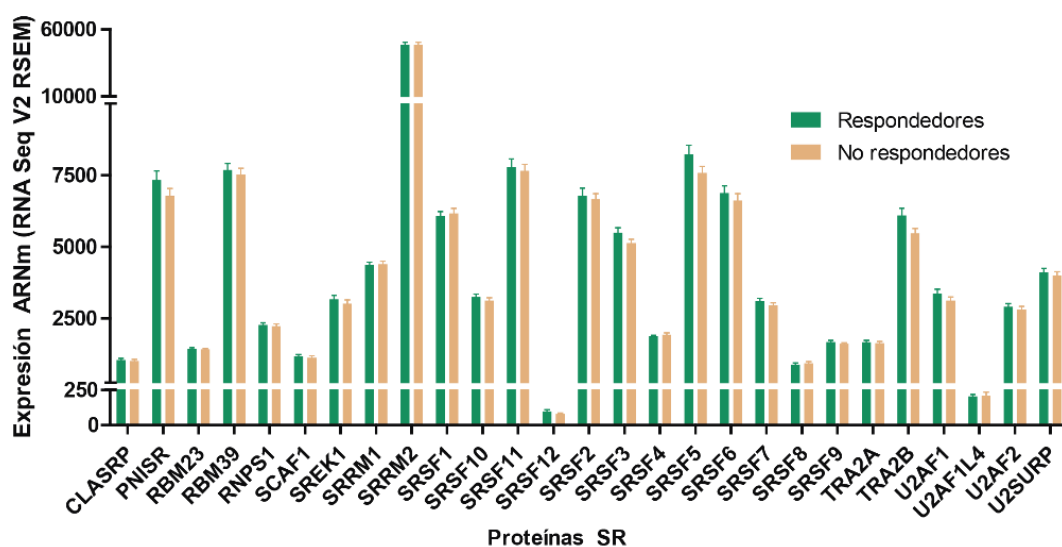
Además, como se muestra en la figura 22B, también se apreciaba un incremento en los niveles de expresión de *SRSF12* en LMA (pacientes 1 – 16), NMP (pacientes N1 – 11) y SMD (pacientes S1 – S12), respecto a muestras control (donantes D1 – D14) ( $n = 52$ ). Sin embargo, dichas diferencias no mostraron significancia estadística.



**Figura 22. Los niveles de expresión génica de *SRRM2* y *SRSF12* se mostraron aumentados en LMA y otras enfermedades mieloides respecto a muestras control.**

(A) Los niveles de expresión de ARN, representados como el  $2\Delta\text{Ct}$  de *SRRM2* en muestras de médula ósea de un grupo control ( $n = 15$ ), pacientes de NMP ( $n = 12$ ), SMD ( $n = 11$ ) y LMA ( $n = 16$ ), en el momento del diagnóstico. (B) Los niveles de expresión de ARN, representados como el  $2\Delta\text{Ct}$  de *SRSF12* en muestras de médula ósea de un grupo de control ( $n = 14$ ), NMP ( $n = 11$ ), SMD ( $n = 11$ ) y LMA ( $n = 16$ ), en el momento del diagnóstico. Los datos representados están normalizados respecto a la expresión de *GUS*. \*  $P \leq 0,05$ , \*\*\*  $P \leq 0,0001$ .

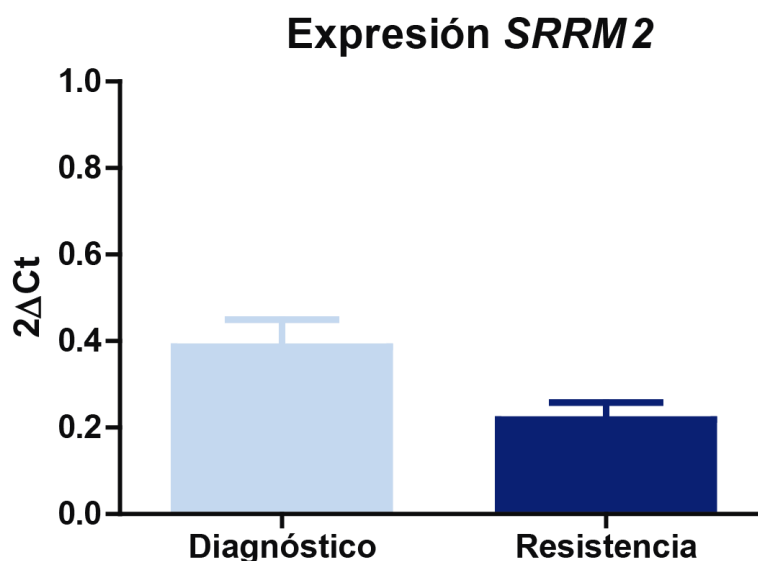
El siguiente paso fue evaluar si estas diferencias en los niveles de expresión de genes codificantes de las proteínas SR podrían estar relacionadas con la respuesta a citarabina. Para ello, se compararon los niveles de expresión de ARN de los datos del proyecto TCGA-LAML entre sí, dividiendo entre pacientes de LMA que alcanzaron respuesta (n = 63) o progresaron en la enfermedad (n = 72) tras recibir un tratamiento constituido por citarabina. De este modo, se observó que no había cambios en los niveles de expresión de ARN de ningún gen codificante de proteínas SR entre el grupo de pacientes libres de enfermedad (respondedores) y los pacientes que presentaron progresión de la leucemia (no respondedores) tras el tratamiento (consulte la figura 23).



**Figura 23. La expresión de genes codificantes de proteínas SR no mostró diferencias entre pacientes con LMA respondedores o no al tratamiento con citarabina.**

Niveles de expresión de ARN mensajero, recogidos en el proyecto TCGA-LAML, de los genes codificantes de proteínas SR en pacientes respondedores (color verde, n = 63) y no respondedores (color naranja, n = 72) tras el tratamiento con citarabina.

Dado que se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *SRRM2* en LMA respecto a controles (véase la figura 22A), el siguiente paso consistió en estudiar si los niveles de expresión del gen además diferían en muestras de pacientes de LMA tras recibir el tratamiento con citarabina. Así, los niveles de expresión de *SRRM2* fueron evaluados en muestras pareadas de pacientes con LMA (diagnóstico vs resistencia farmacológica, n = 7, pacientes 10 – 15 y 17) mediante PCR cuantitativa. Los resultados obtenidos no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas (P = 0,1083) en los niveles de expresión de ARN entre los momentos de diagnóstico y tras el fallo del tratamiento con citarabina (resistencia) (véase la figura 24).



**Figura 24.** La expresión génica de *SRRM2* se mantuvo en siete pacientes con LMA tras recibir esquemas de tratamiento con citarabina y desarrollar resistencia.

Se muestran los niveles de expresión génica de *SRRM2*, representados como el  $2\Delta Ct$  del gen (respecto a la expresión de *GUS*) en muestras pareadas (al diagnóstico y tras el fallo del tratamiento con citarabina) de ARN de médula ósea de pacientes enfermos de leucemia mieloide aguda ( $n = 7$ ).

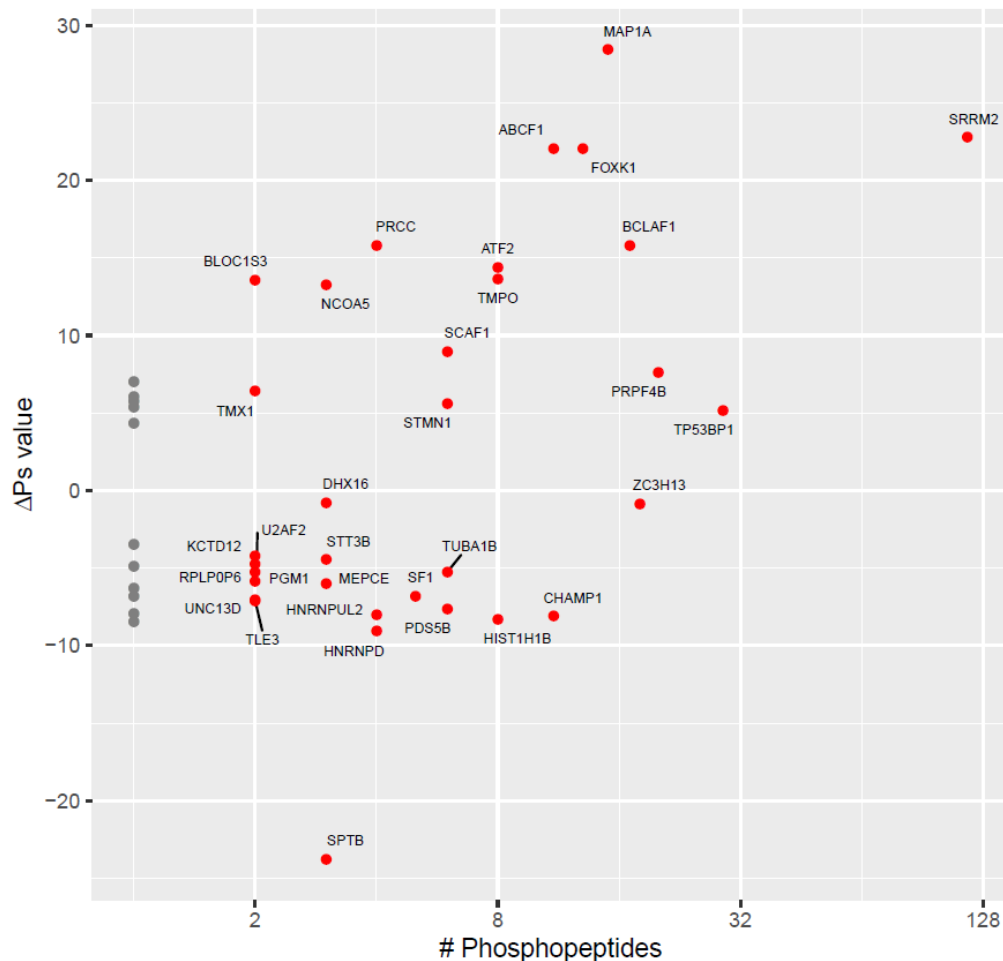
En base a los experimentos previamente expuestos, se podía confirmar que las diferencias observadas en los niveles de expresión génica de algunas proteínas SR, como *SRRM2*, respecto a controles, estaban relacionadas no sólo con la LMA, sino también con otras enfermedades mieloides, pero no con la respuesta a citarabina.

#### **4.1.1.2. Las variaciones en la fosforilación de las proteínas SR se relacionaban con la respuesta farmacológica a citarabina**

Dado que los resultados previos descartaban la presencia de alteraciones en la expresión génica de genes codificantes de las proteínas SR en el desarrollo de resistencia a citarabina, el siguiente paso fue estudiar si dicha resistencia pudiera deberse a alteraciones a nivel funcional.

Para ello, se realizó la comparativa del perfil fosfo-proteómico de tres pacientes de LMA, antes y después del tratamiento con el fármaco. Los estudios fosfo-proteómicos de muestras *ex vivo* de pacientes de LMA han mostrado previamente una gran utilidad a la hora de detectar vías de señalización cuya activación estuviera alterada para la selección de los tratamientos más efectivos en cada caso <sup>193,194</sup>.

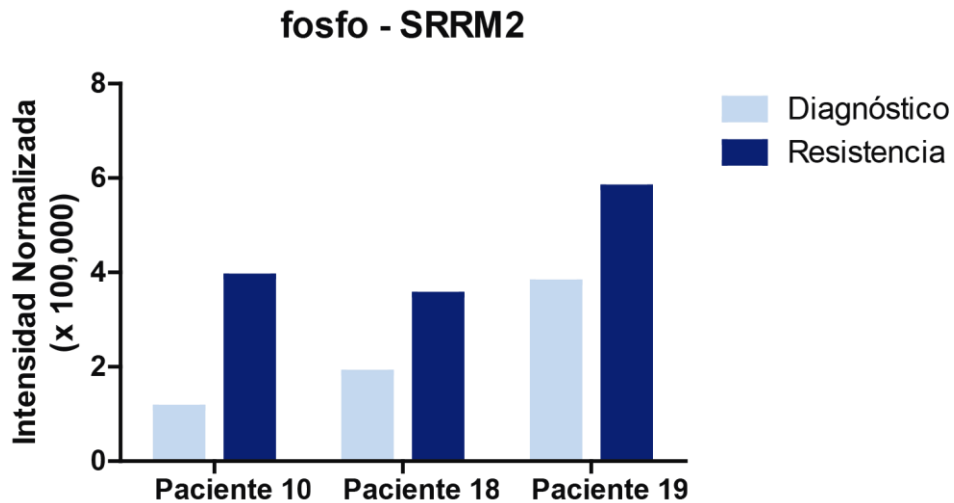
Así, para averiguar el estado de fosforilación de las proteínas tras el tratamiento con citarabina, se recogieron muestras pareadas de pacientes con LMA al diagnóstico y tras el desarrollo de la resistencia farmacológica, ya fuera en modo de refractariedad primaria o como una recaída tras haber alcanzado la remisión completa. De este modo, se comparó el perfil fosfo-proteómico de tres pacientes con LMA (pacientes 10, 18 y 19) mediante LC-MS/MS posterior al enriquecimiento de los fosfo-péptidos por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados. Se observó que entre ambas condiciones existían cambios significativos en los niveles de fosforilación de ciertas proteínas, entre ellas, algunas proteínas SR como la ya mencionada SRRM2 (véase la figura 25).



**Figura 25. La comparativa pareada de los perfiles fosfo-proteómicos de tres pacientes con LMA mostró alteraciones en la fosforilación de SRRM2 y otras proteínas SR.**

Se muestran representadas las proteínas cuya fosforilación sufre un cambio (positivo o negativo) de manera significativa tras el tratamiento con citarabina en los tres pacientes estudiados. Se representan los niveles de cambio en la fosforilación de las proteínas ( $\Delta$ PS value) entre las condiciones de diagnóstico y resistencia del conjunto de pacientes.

Además, al realizar la comparativa de los niveles de fosforilación proteica de manera individual (diagnóstico vs resistencia de cada paciente), SRRM2 fue la única proteína que mostró un incremento significativo en su fosforilación en los tres pacientes tras el desarrollo de la resistencia farmacológica (observe la figura 26).



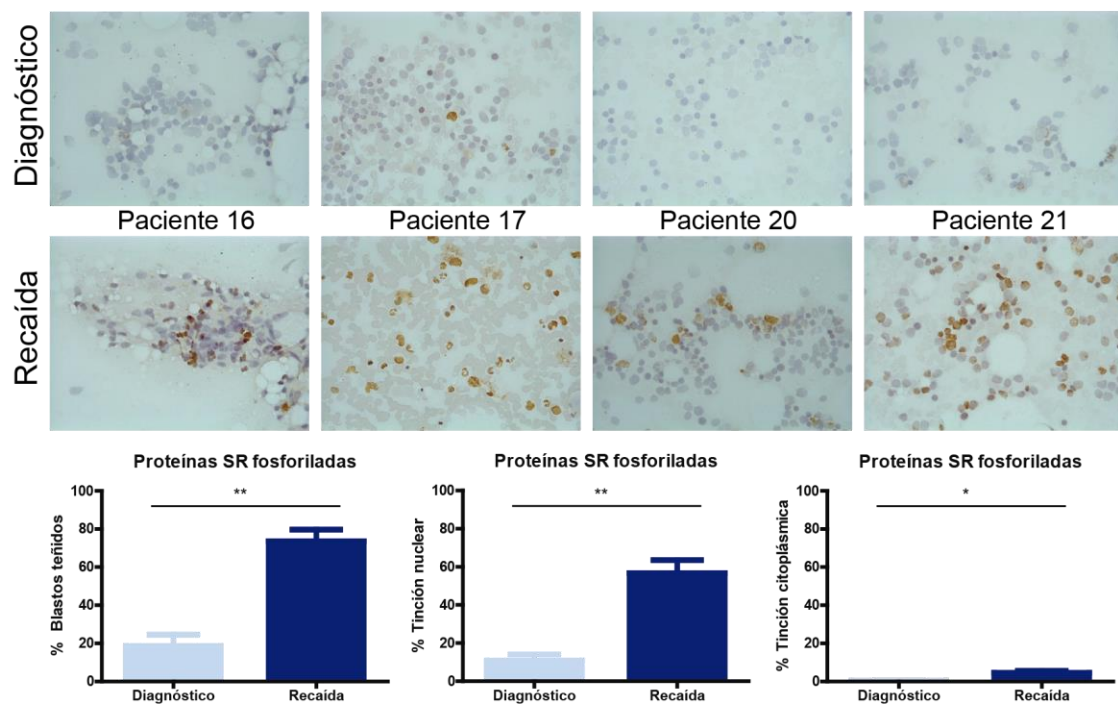
**Figura 26. Los niveles de fosforilación de SRRM2 estaban aumentados durante la resistencia a citarabina en tres pacientes con LMA respecto a sus diagnósticos.**

La intensidad de señal recogida del conjunto de fosfoepítopos de SRRM2 mostró un incremento en el momento de resistencia farmacológica a citarabina en las muestras *ex vivo* de los tres pacientes de LMA testados.

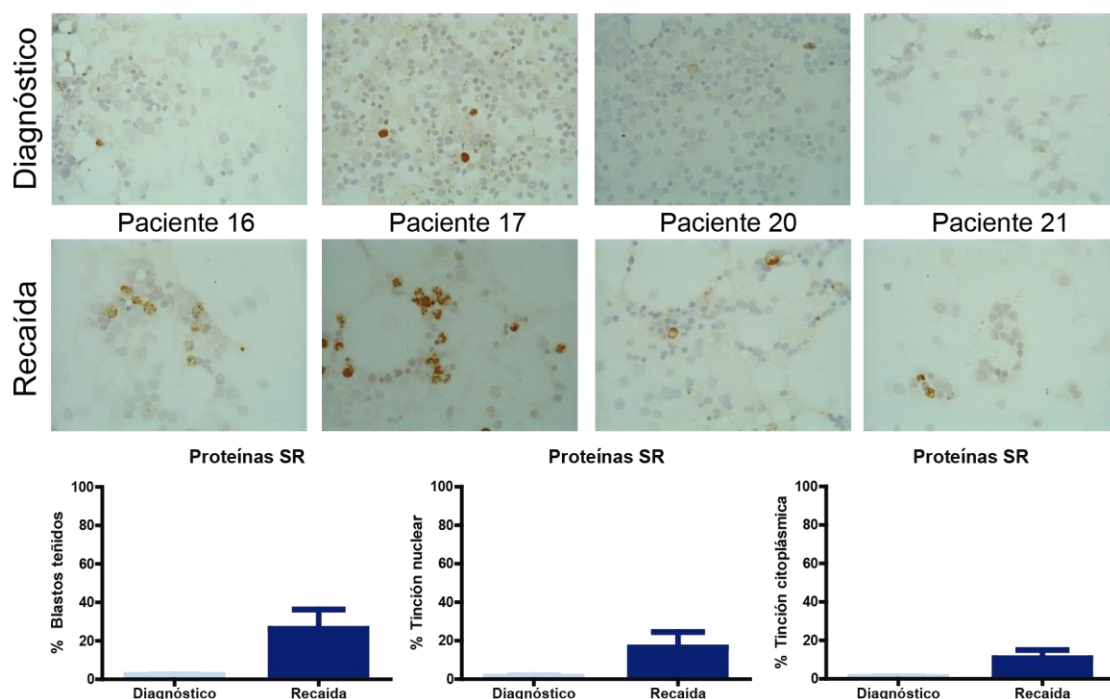
Algunos autores han descrito que la hiper- e hipo- fosforilación de las proteínas SR altera su funcionalidad, haciéndolas incapaces de participar correctamente en los mecanismos de corte y empalme del ARN mensajero<sup>60</sup>. Por ello, los resultados expuestos sugerían que, aunque no existían cambios en los niveles de expresión génica de las proteínas SR durante la resistencia a citarabina, sí podría existir una alteración en la actividad de estas, que posiblemente podría traducirse en un proceso aberrante del corte y empalme del ARN mensajero.

Dado el incremento observado en la fosforilación de proteínas SR durante la resistencia a citarabina, el siguiente paso fue validar dichos cambios mediante otra técnica de estudio. Los niveles de fosforilación de las proteínas SR fueron estudiados mediante inmunohistoquímica en muestras pareadas de médula ósea de 4 pacientes de LMA (pacientes 16, 17, 20 y 21) al diagnóstico y en el momento de la recaída tras el tratamiento con citarabina (observe la figura 27A).

**A** Proteínas SR fosforiladas



**B** Proteínas SR



**Figura 27.** La fosforilación de las proteínas SR estaba aumentada en pacientes que presentaron una recaída en la enfermedad tras el tratamiento con citarabina.

(A) Estudios inmunohistoquímicos para proteínas SR fosforiladas en muestras de médula ósea al diagnóstico y en la recaída de pacientes de LMA y el porcentaje de blastos teñidos, clasificados además como tinción citoplásmica o nuclear. (B) Estudios inmunohistoquímicos para la presencia de proteínas SR en muestras de médula ósea al diagnóstico y en la recaída de pacientes de LMA y el porcentaje de blastos teñidos, clasificados además como tinción citoplásmica o nuclear.

De este modo, se observaron mayores niveles de proteínas SR fosforiladas en el momento de la recaída en comparación al momento del diagnóstico de la enfermedad.

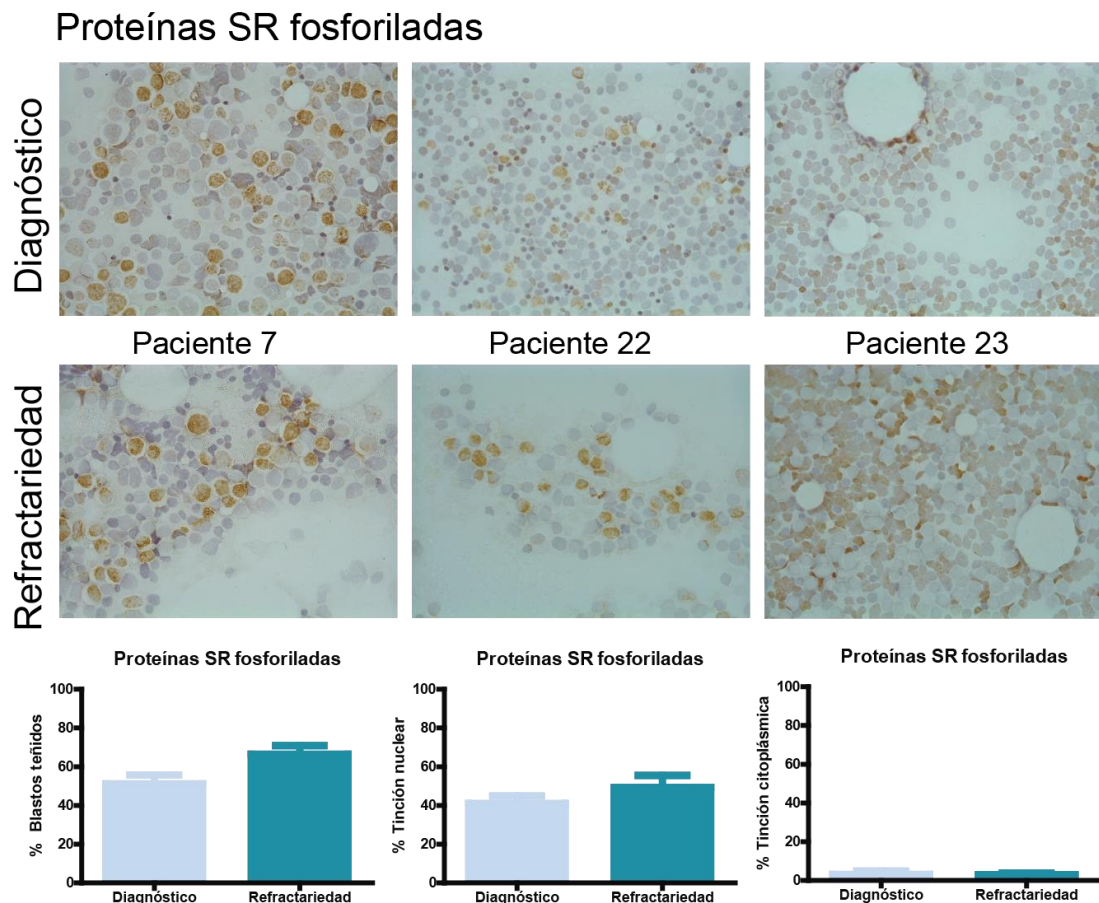
Puesto que se ha descrito una relación clara entre el estado de fosforilación de estas proteínas, su localización subcelular y función, el tipo de tinción presentada en cada blasto se clasificó como citoplásmica o nuclear. Se observó así que el incremento en la fosforilación de las proteínas SR se daba en ambas localizaciones subcelulares.

Estos cambios observados a nivel de proteínas SR en su forma fosforilada tanto a nivel citoplásmico como nuclear no se debieron a incrementos en los niveles basales de las proteínas SR (véase la figura 27B), donde empleando las mismas muestras de los mismos pacientes (pacientes 16, 17, 20 y 21), no se apreciaron incrementos significativos en los niveles de estas entre ambas condiciones.

De esta manera, al igual que se apreciaba en los experimentos previamente descritos, concretamente, para SRRM2 a nivel de ARN mensajero, no se apreciaban diferencias a nivel de expresión basal.

Todo ello, sugería que los niveles de fosforilación de las proteínas SR podrían tener un papel específico en el desarrollo de resistencias farmacológicas a citarabina en los pacientes diagnosticados de LMA.

Con el fin de investigar si este hecho podía ocurrir también en pacientes que mostraron refractariedad primaria al tratamiento con citarabina, se estudiaron los niveles de las proteínas SR en su forma fosforilada en muestras pareadas de tres pacientes de LMA, al diagnóstico y en la refractariedad tras haber recibido el compuesto (pacientes 7, 22 y 23) (consulte la figura 28).



**Figura 28. La fosforilación de las proteínas SR no estaba aumentada en pacientes que mostraron refractariedad al tratamiento con citarabina.**

Estudios inmunohistoquímicos para las proteínas SR fosforiladas en muestras de médula ósea al diagnóstico y en la refractariedad de pacientes de LMA y el porcentaje de blastos teñidos a nivel citoplásmico o nuclear.

En esta nueva comparativa, no se observó un incremento en los niveles de proteínas SR fosforiladas entre ambas condiciones, ni tampoco cambios significativos en la localización subcelular de las proteínas fosforiladas. Sin embargo, si se pudo observar que dichos niveles parecían ser bastante mayores en el momento del diagnóstico de los pacientes que resultaron refractarios respecto al diagnóstico de los pacientes que presentaron una recaída en la enfermedad tras haber alcanzado la remisión completa (observe la figura 27A).

De modo que los resultados sugerían una posible relación entre una mayor presencia de proteínas SR fosforiladas al diagnóstico de pacientes refractarios y resistencia inherente al tratamiento con citarabina.

Como los resultados expuestos previamente mostraban un incremento notable en los niveles de fosforilación de las proteínas SR al diagnóstico de pacientes refractarios respecto al diagnóstico de pacientes que respondieron al tratamiento y posteriormente mostraron una recaída, se realizó dicha comparativa en un número mayor de casos para averiguar si los niveles de fosforilación de las proteínas SR pudieran emplearse como un biomarcador predictivo de la respuesta farmacológica a citarabina.

Para ello, se seleccionaron 64 pacientes de LMA que hubieran recibido el tratamiento con citarabina y respondido (respondedores (pacientes 8, 12, 14 – 17, 19 – 21, 24 – 57), n = 43), alcanzando respuesta completa en algún momento; o que hubieran presentado refractariedad primaria, y, por tanto, no hubieran alcanzado respuesta completa (no respondedores (pacientes 6, 7, 10, 11, 13, 18, 22, 23, 58 – 70), n = 21).

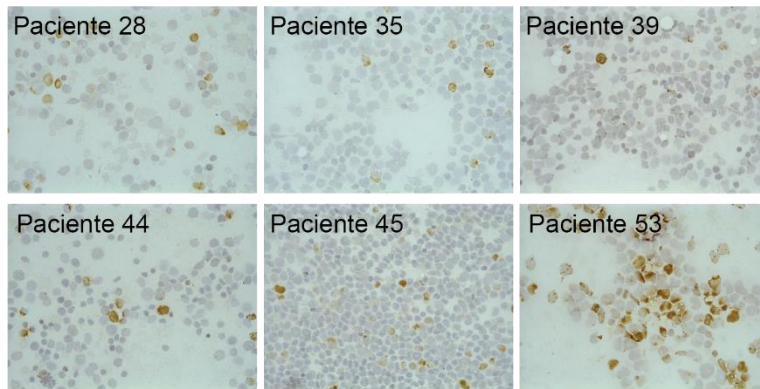
De este modo, se cuantificó el porcentaje de blastos teñidos mediante inmunohistoquímica en las muestras de diagnóstico de LMA de los 64 pacientes, así como su localización, citoplásmica o nuclear en modo “ciego”, sin conocerse el grupo al que pertenecían.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo en los niveles de proteínas SR fosforiladas en el grupo de pacientes no respondedores, en comparación al grupo de pacientes respondedores (véase la figura 29 y el anexo 5).

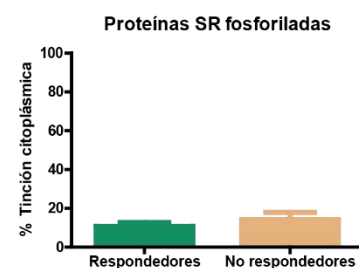
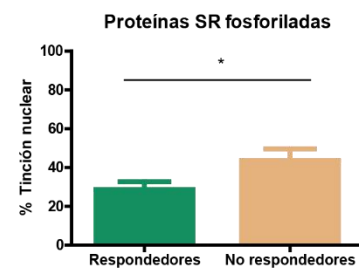
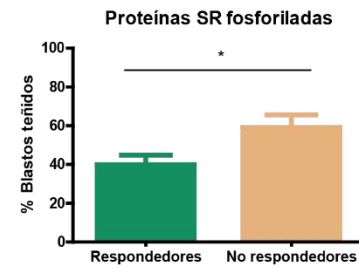
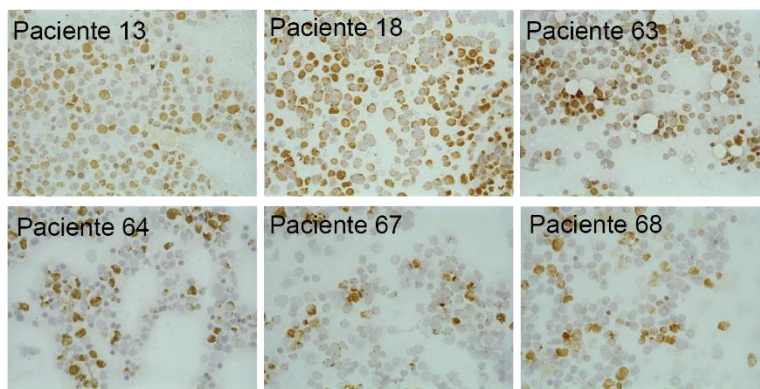
Además, la tinción observada en los pacientes no respondedores se daba predominantemente a nivel nuclear, mostrando una posible alteración de la localización subcelular de las proteínas SR en los casos de resistencia inherente a citarabina.

Dadas estas observaciones, los niveles de proteínas SR fosforiladas podrían emplearse como un biomarcador predictivo de la respuesta a citarabina.

Respondedores



No respondedores



**Figura 29. Los niveles de proteínas SR en su forma fosforilada fueron mayores al diagnóstico de pacientes que no respondieron al tratamiento con citarabina.**

Estudios inmunohistoquímicos de las proteínas SR fosforiladas en muestras de médula ósea al diagnóstico de pacientes respondedores (n = 43) y no respondedores (n = 21) al tratamiento con citarabina (n = 64). Se muestran imágenes representativas de cada grupo, así como, el porcentaje total de blastos teñidos, y su tinción a nivel citoplásmico o nuclear. El conjunto total de imágenes se encuentra recogido en el anexo 5.

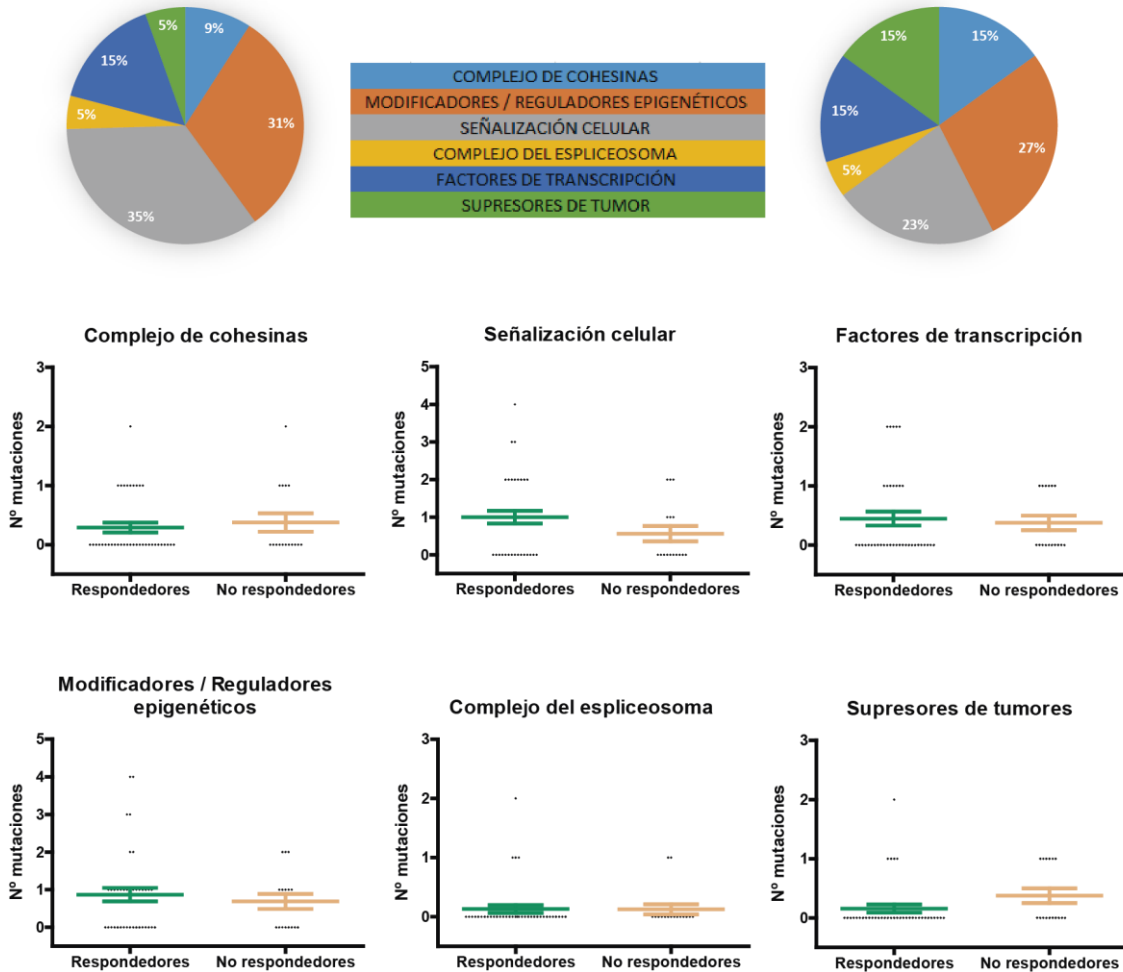
Para descartar que las diferencias encontradas a nivel de fosforilación de las proteínas SR pudieran explicarse por el fondo genético mutacional de los pacientes, se recogió el perfil mutacional correspondiente a cada uno de los enfermos de los que hubiera información disponible (respondedores, n = 38, y no respondedores, n = 16).

Así, se comparó el número de mutaciones de cada categoría funcional (genes del complejo de cohesinas, genes modificadores / reguladores epigenéticos, genes de señalización celular, genes del complejo del espliceosoma, factores de transcripción, genes supresores de tumores) presente en cada grupo de pacientes.

No se observaron diferencias en el fondo genético de los pacientes, en especial, tampoco en la categoría de genes del complejo del espliceosoma entre ambos grupos (véase la figura 30). Con lo cual, se descartaba que las diferencias observadas a nivel de fosforilación de las proteínas SR estuvieran relacionadas con distinciones en el fondo genético de cada grupo de pacientes (respondedores y no respondedores).

**Respondedores (n = 38)**

**No respondedores (n = 16)**



**Figura 30. El perfil mutacional de los pacientes respondedores (n = 38) y no respondedores (n = 16) al tratamiento con citarabina no se vio modificado.**

Representación del número de mutaciones en genes de las categorías funcionales: genes del complejo de cohesinas, genes modificadores / reguladores epigenéticos, genes de señalización celular, genes del complejo del espliceosoma, factores de transcripción, genes supresores de tumores, de cada grupo de pacientes.

#### **4.1.1.3. Las variaciones observadas en los niveles de fosforilación de las proteínas SR en pacientes de LMA resistentes a citarabina se vincularon con alteraciones en el mecanismo de corte y empalme del ARN mensajero**

Se ha recogido en la literatura que la fosforilación de las proteínas SR modula su localización subcelular y migración desde los *nuclear speckles* hasta los lugares de transcripción activa, aunque no se han relacionado lugares concretos de fosforilación que lo determinen <sup>43</sup>.

Además, como ya se ha comentado, se ha descrito que la hiper- e hipo- fosforilación de las proteínas SR generan alteraciones en el mecanismo de corte y empalme provocando un *splicing* aberrante, que ha sido ampliamente descrito en LMA<sup>60</sup>.

De hecho, diversos estudios han puesto de manifiesto ciertas alteraciones en dianas concretas de algunas proteínas SR cuando éstas están alteradas, ya sea por mutaciones en las mismas o por alteraciones de su actividad <sup>51,54,139,186–191</sup>.

Por ejemplo, se han descrito alteraciones en el corte y empalme alternativo de *EZH2* en células mutantes para *SRSF2* <sup>54,139</sup>. Y se ha relacionado la falta de actividad de *SRSF1* con alteraciones en el *splicing* alternativo de *Rac1b* <sup>51</sup>, o su aumento de actividad con una mayor inclusión del exón 5a para generar una isoforma alternativa más tumorigénica de *BCLAF1* <sup>187</sup>.

Como último ejemplo, también se ha descrito el enriquecimiento significativo de varias rutas de señalización al silenciar *SRRM2* por *knockdown* <sup>188</sup>, como el aumento de actividad de vías de secreción de citoquinas pro-inflamatorias, o de manera concreta un aumento en los niveles de MYLK, PKG, Bax y Caspasa 3, y una disminución en los niveles de VEGF, PCNA, Ki-67 y Bcl-2 al silenciar una forma alternativa del gen <sup>186</sup>.

Los resultados descritos previamente, ponían de manifiesto la presencia de alteraciones en la fosforilación de las proteínas SR y posiblemente su actividad, en pacientes de LMA que mostraban resistencia intrínseca (no respondedores) o adquirida (respondedores) tras el tratamiento con citarabina.

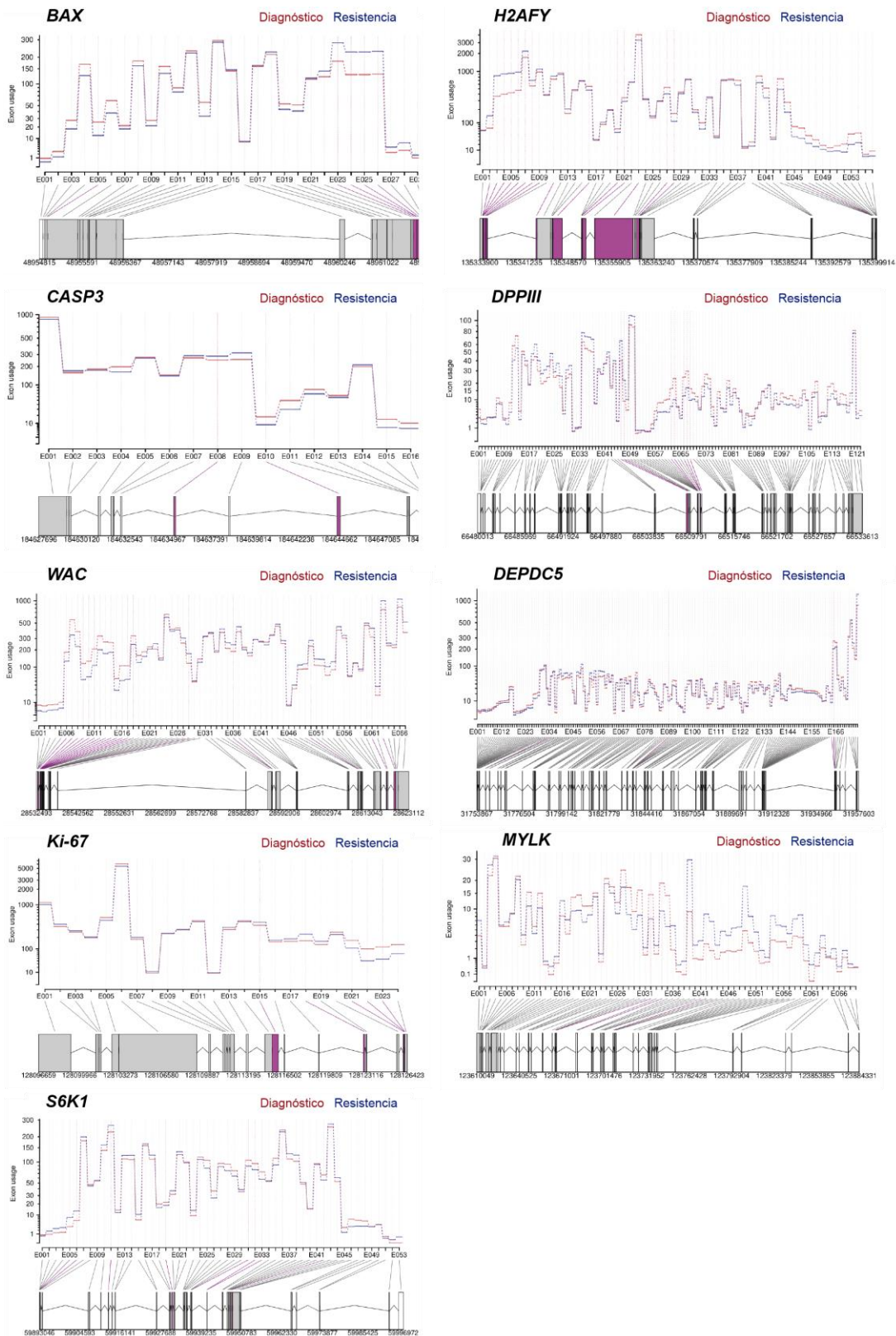
Por ello, el siguiente paso fue estudiar si estas alteraciones pudieran afectar también al correcto funcionamiento de los mecanismos de corte y empalme del ARN mensajero.

Para ello, se generaron librerías de ARN de muestras pareadas (al diagnóstico y tras la respuesta al tratamiento con citarabina) de 25 pacientes de LMA (pacientes 2 – 17, 33, 62, 63, 65, 71 – 75).

Los datos secuenciados fueron enviados a la empresa Dreamgenics, la cual se encargó de realizar un análisis del uso diferencial de exones o DEU <sup>185</sup> comparando de manera individual el perfil del diagnóstico y de la resistencia farmacológica en cada uno de los pacientes.

Con estos datos, se realizó la búsqueda dirigida de algunos genes dianas de las proteínas SR descritos <sup>51,54,139,186–191</sup> y cuál era su uso de exones entre los momentos de diagnóstico y de resistencia al tratamiento. Pues, de haber una alteración en la fosforilación de las proteínas SR que pudiera afectar a su funcionalidad, las dianas de dichas proteínas se verían directamente afectadas.

De este modo, se identificó el uso diferencial de exones de los genes dianas de proteínas SR *BAX*, *Ki-67*, *CASP3*, *S6K1*, *WAC*, *H2AFY*, *DPPIII*, *DEPDC5* y *MYLK* (véase la figura 31) entre el momento del diagnóstico y el momento de la resistencia farmacológica, confirmando así que existía una alteración en los mecanismos de corte y empalme del ARN mensajero que podía estar relacionada con la respuesta a citarabina en LMA, mediante la alteración de la función de las proteínas SR.



**Figura 31. Algunas dianas de proteínas SR presentan alteraciones en el corte y empalme del ARN mensajero.**

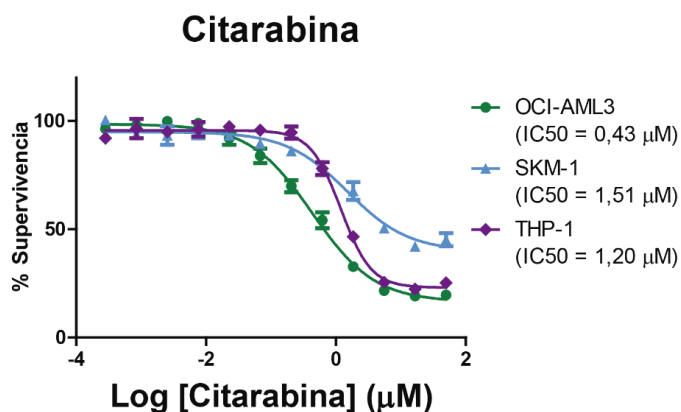
Se muestran los gráficos de uso diferencial de exones para *BAX*, *CASP3*, *WAC*, *Ki-67*, *S6K1*, *H2AFY*, *DPPIII*, *DEPDC5* y *MYLK* entre las condiciones de diagnóstico (en rojo) y resistencia a citarabina (en azul).

## 4.1.2. EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL PROCESO DE CORTE Y EMPALME DEL ARN MENSAJERO EN MONOTERAPIA Y EN COMBINACIÓN EN MODELOS *IN VITRO* DE LA ENFERMEDAD

### 4.1.2.1. El tratamiento farmacológico con inhibidores de corte y empalme del ARN mensajero presentó actividad antitumoral en modelos celulares de leucemia mieloide aguda

Debido a la evidente alteración de los mecanismos de corte y empalme en la leucemia mieloide aguda y su aparente relación con la resistencia a citarabina, se decidió estudiar el efecto de distintos inhibidores de *splicing* en un contexto de LMA.

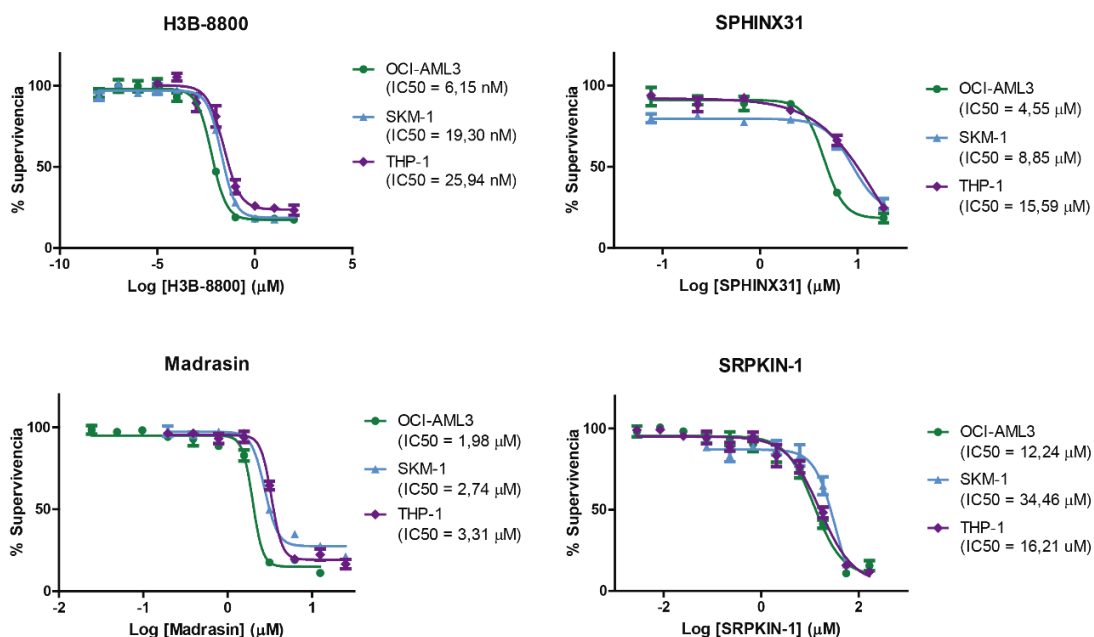
Para ello, se seleccionaron tres líneas celulares, representativas de diferentes entidades subclínicas de LMA (OCI-AML3, SKM-1 y THP-1), las cuales mostraban sensibilidades farmacológicas similares a citarabina (véase la figura 32), todas ellos con valores de IC50 en el rango micromolar.



**Figura 32.** La citarabina mostró efectividad en el rango micromolar en las tres líneas celulares modelo de LMA empleadas.

Curvas de dosis-respuesta en OCI-AML3, SKM-1 y THP-1 para citarabina.

En dichas líneas, se observaba, además, que los cuatro inhibidores del *splicing* testados, H3B-8800, madrasin, SPHINX31 y SRPKIN-1, inhibían el crecimiento celular *in vitro*. Así, se apreciaba que mientras que madrasin, SPHINX31 y SRPKIN-1 inhibieron el crecimiento en el rango micromolar, H3B-8800 lo hacía en el rango nanomolar (figura 33). Además, la línea OCI-AML3 mostró el mejor ajuste de la respuesta a todos los inhibidores ensayados.



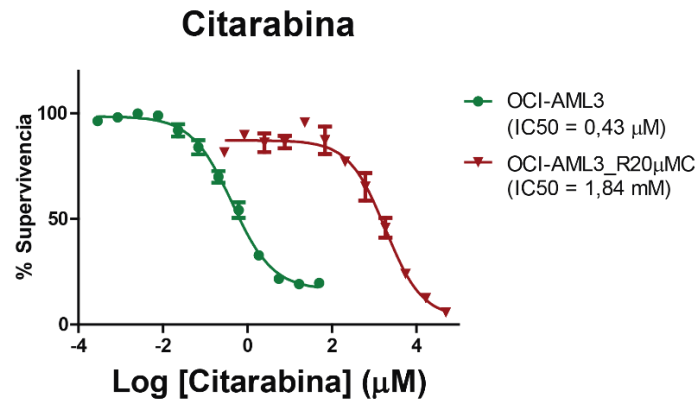
**Figura 33. H3B-8800 mostró la mayor eficacia en las líneas celulares testadas.**

Curvas de dosis-respuesta en OCI-AML3, SKM-1 y THP-1 para los inhibidores de splicing H3B-8800, madrasin, SPHINX31 y SRPKIN-1.

#### **4.1.2.2. Los inhibidores del espliceosoma fueron efectivos en modelos *in vitro* de resistencia a citarabina de la enfermedad**

Como las células OCI-AML3 mostraron la respuesta farmacológica más sensible a citarabina y más ajustada para los inhibidores del espliceosoma, se empleó dicha línea celular modelo de LMA para generar un modelo *in vitro* de resistencia farmacológica al compuesto.

La línea celular parental OCI-AML3 se expuso a dosis crecientes del fármaco durante alrededor de un mes hasta alcanzar la dosis de citarabina a 20 µM, dosis con la que se mantuvo su crecimiento. La nueva línea OCI-AML3\_R20µMC (véase la figura 34) mostraba alrededor de 4000 veces menor sensibilidad al compuesto citarabina que su parental OCI-AML3.

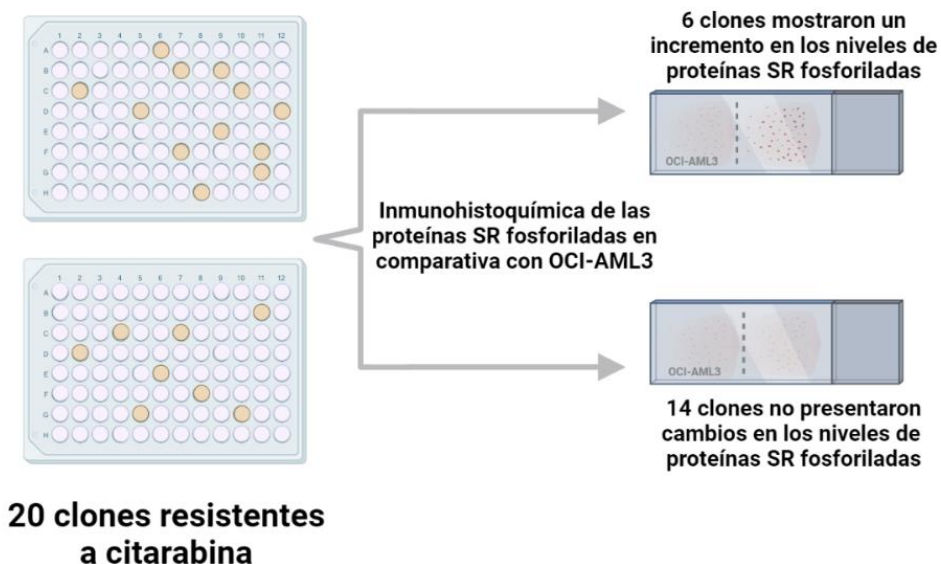


**Figura 34.** La línea resistente a citarabina generada, OCI-AML3\_R20µMC, mostró una IC50 aproximadamente 4000 veces mayor que la de su línea parental OCI-AML3.

Curvas de dosis-respuesta en OCI-AML3 y OCI-AML3\_R20µMC para citarabina.

Como se ha explicado en el apartado “3.3. Cultivos celulares y generación de modelos de resistencia”, a partir de este modelo, se realizó un protocolo de dilución límite para aislar distintos clones resistentes a citarabina, obteniéndose un total de 20 clones independientes (observe la figura 13).

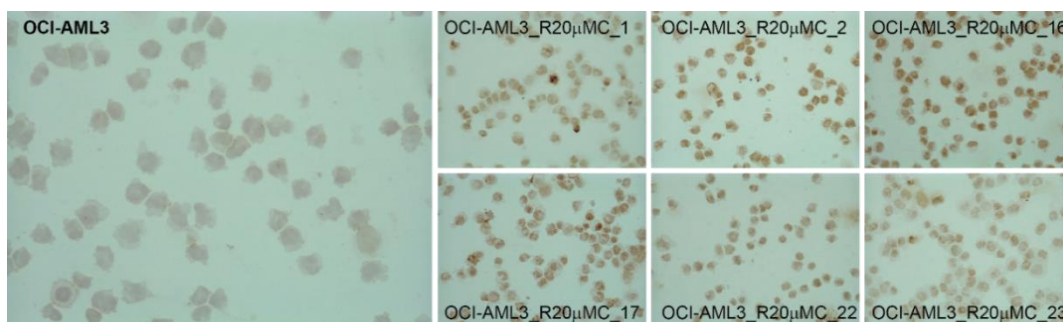
A continuación, se analizaron los niveles de las proteínas SR fosforiladas mediante inmunohistoquímica en los 20 clones resistentes a citarabina respecto al cultivo parental OCI-AML3 (consulte la figura 35).



**Figura 35.** Esquema de selección de clones individuales aislados a partir del modelo de resistencia OCI-AML3\_R20µMC mediante inmunohistoquímica.

Seis de los 20 clones resistentes a citarabina aislados presentaron un incremento en los niveles de las proteínas SR fosforiladas respecto al control parental OCI-AML3.

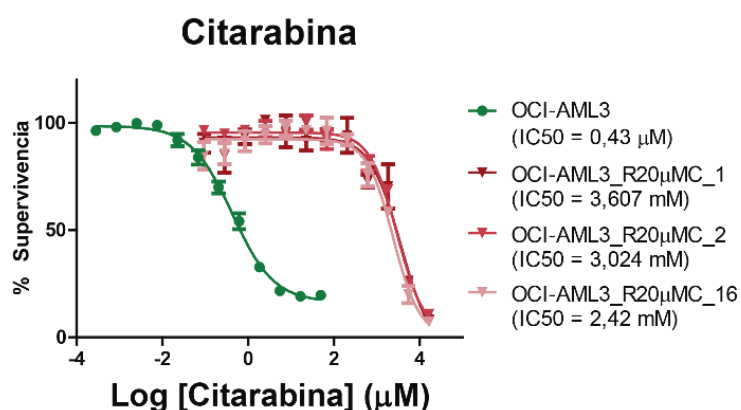
Así, se seleccionaron 6 líneas clonales que mostraron mayores niveles de proteínas SR fosforiladas con respecto al cultivo sensible (consulte la figura 36), y que, por tanto, simulaban la situación observada *ex vivo* en las extensiones de médula ósea de pacientes con LMA en recaída tras el tratamiento con citarabina (véase la figura 27).



**Figura 36. Seis de los 20 clones resistentes aislados mostraron mayor fosforilación de las proteínas SR respecto a la línea parental.**

Inmunohistoquímica de los 6 clones resistentes a citarabina seleccionados que mostraron mayor fosforilación de las proteínas SR respecto a la línea parental OCI-AML3.

En aquellos clones que mostraron los mayores niveles de tinción (clones 1, 2 y 16) se caracterizó la respuesta a citarabina mediante curvas de dosis-respuesta (figura 37). Todos los clones aislados mantuvieron unos valores de IC50 bastante superiores a los observados en la línea parental sensible a citarabina, OCI-AML3, destacando el clon OCI-AML3\_R20µMC\_1 que mostraba la mayor resistencia farmacológica al compuesto.



**Figura 37. Los clones resistentes a citarabina 1, 2 y 16 mostraron valores de IC50 superiores a los observados en la línea parental OCI-AML3.**

Curvas de dosis-respuesta en OCI-AML3 y OCI-AML3\_R20µMC\_1, OCI-AML3\_R20µMC\_2 y OCI-AML3\_R20µMC\_16 para citarabina.

Los clones resistentes, OCI-AML3\_R20 $\mu$ MC\_1, OCI-AML3\_R20 $\mu$ MC\_2 y OCI-AML3\_R20 $\mu$ MC\_16, también se emplearon para estudiar la sensibilidad farmacológica frente a los inhibidores del proceso de corte y empalme del ARN mensajero, H3B-8800, madrasin, SPHINX31 y SRPKIN-1 (figura 38), mostrando que mantenían una eficacia similar a la observada en los cultivos sensibles (figura 33).

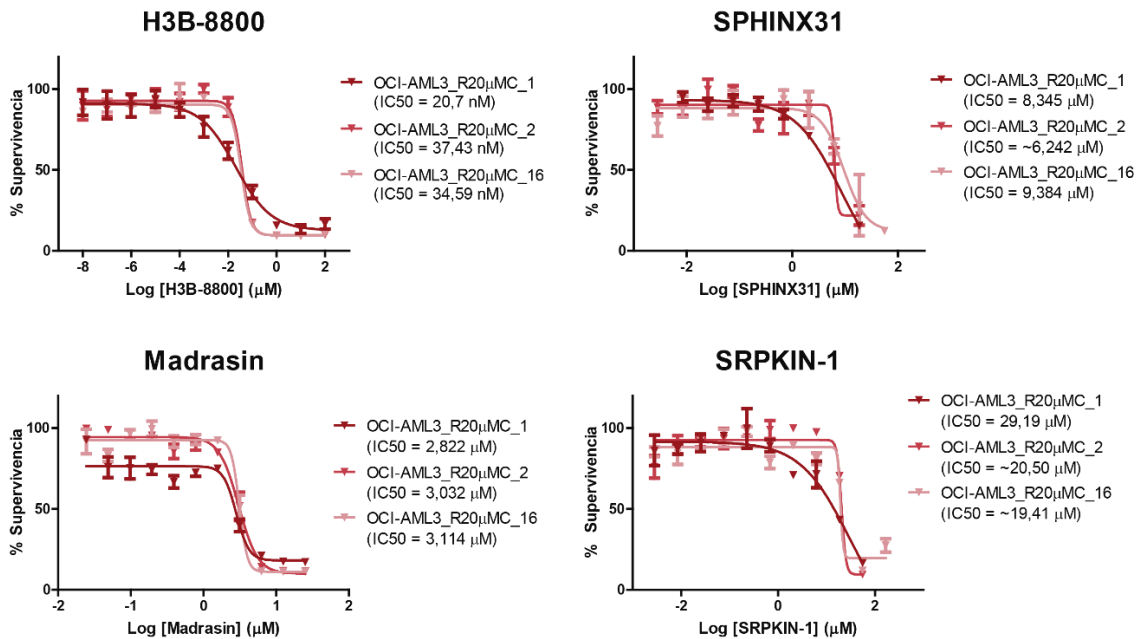


Figura 38. Los clones resistentes 1, 2 y 16 mostraron valores de IC50 para los inhibidores de *splicing* similares a los observados en la línea parental OCI-AML3.

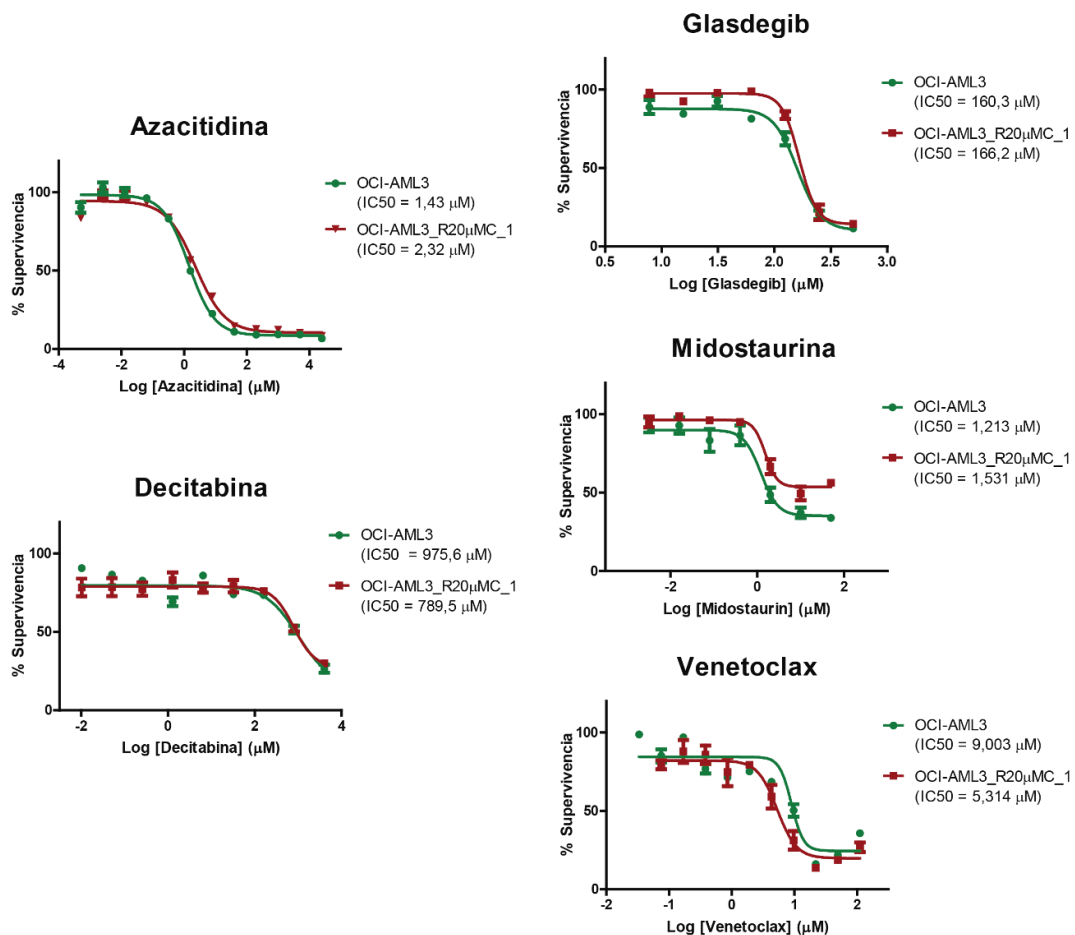
Curvas de dosis-respuesta en OCI-AML3 y OCI-AML3\_R20 $\mu$ MC\_1, OCI-AML3\_R20 $\mu$ MC\_2 y OCI-AML3\_R20 $\mu$ MC\_16 para H3B-8800, madrasin, SPHINX31 y SRPKIN-1.

En este caso, el clon OCI-AML3\_R20 $\mu$ MC\_1 además, mostró la mayor sensibilidad a la mayoría de los inhibidores del proceso de *splicing* testados, entre ellos H3B-8800, por lo que fue seleccionado para los estudios posteriores que se detallan a continuación.

#### 4.1.2.3. La combinación de un inhibidor de *splicing* junto a otras terapias clínicas aprobadas podría ser una buena opción terapéutica para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda

Como H3B-8800 mostró el mejor perfil de eficacia en las líneas celulares modelo de LMA sensible y resistente a citarabina (consulte las figuras 33 y 38), se testó si la combinación de éste con otros inhibidores aprobados para su uso en leucemia mieloide aguda (citarabina, azacitidina, decitabina, glasdegib, midostaurina y venetoclax) podría mostrar un efecto sinérgico *in vitro*.

Para ello, se analizaron los valores de IC50 de cada fármaco en OCI-AML3 y OCI-AML3\_R20μMC\_1 (figura 39). Ninguno de los fármacos ensayados mostró resistencia cruzada con citarabina, observándose valores de IC50 similares tanto para la línea sensible como la línea resistente. Así, se apreciaba que todos ellos podrían ser útiles incluso en las situaciones de resistencia farmacológica al tratamiento con citarabina.



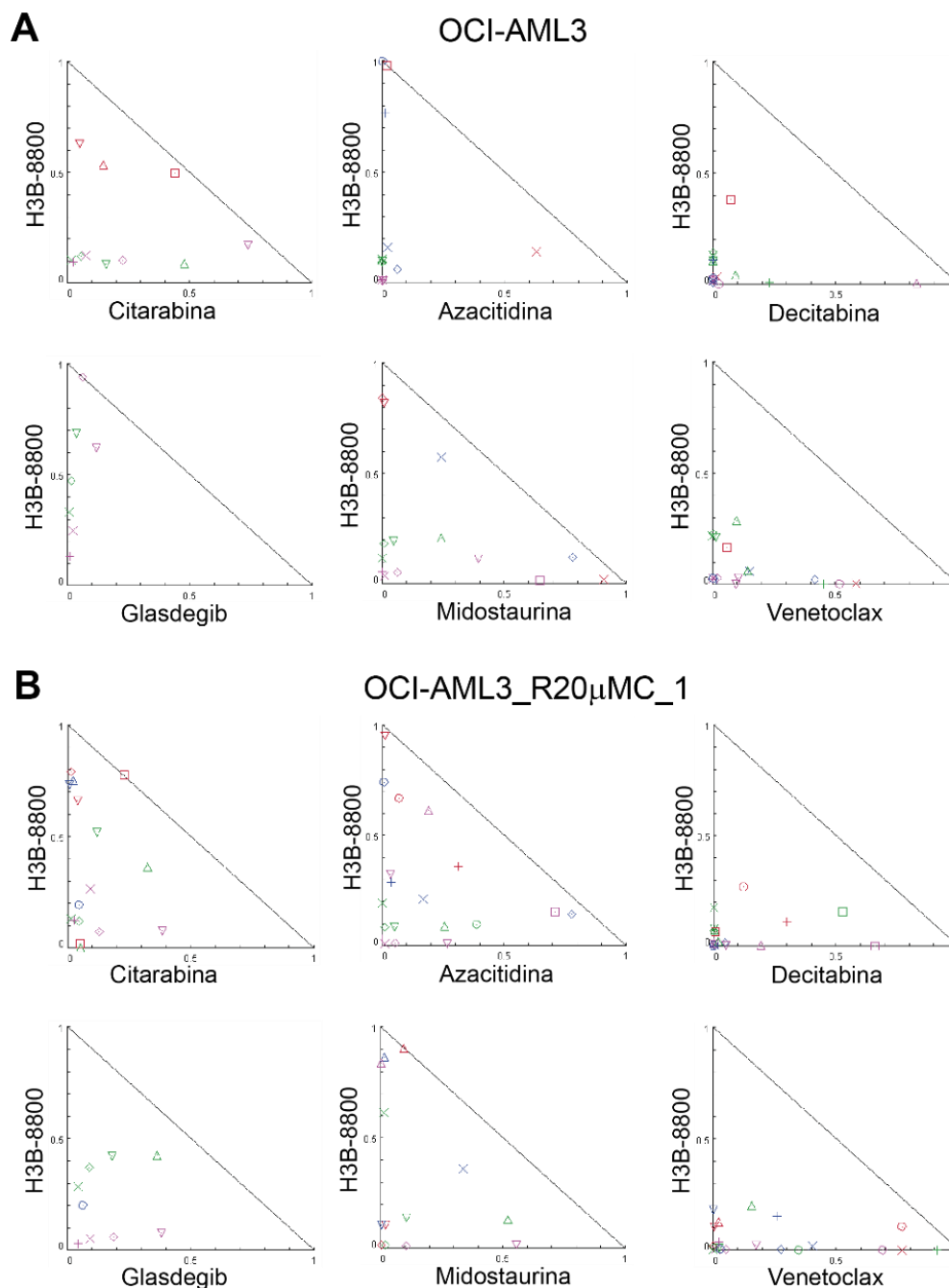
**Figura 39. Todos los fármacos ensayados mostraron efectividades similares en las líneas sensible y resistente a citarabina.**

Curvas de dosis-respuesta en OCI-AML3 y OCI-AML3\_R20μMC\_1 para azacitidina, decitabina, glasdegib, midostaurina y venetoclax.

Las combinaciones de H3B-8800 con cada uno de los fármacos ensayados fueron evaluadas (consulte las dosis empleadas en la tabla 10) en las líneas OCI-AML3 y OCI-AML3\_R20μMC. La primera combinación ensayada fue H3B-8800 con citarabina.

Se observó que dicha combinación actuó de manera sinérgica en la línea sensible OCI-AML3 (observe la figura 40A) y mantuvo su efectividad en la línea resistente OCI-AML3\_R20μMC\_1 (figura 40B), apoyando su uso como nueva opción terapéutica incluso en la condición de resistencia farmacológica a citarabina.

Sin embargo, debido a los importantes problemas de toxicidad en médula ósea asociados al tratamiento con citarabina, se continuó testando el uso combinado de H3B-8800 con otros fármacos aprobados para el tratamiento de la LMA con la finalidad de escoger la combinación más apropiada y efectiva.



**Figura 40. La combinación de H3B-8800 con venetoclax mostró la mayor potencia citotóxica.**

(A) Isobogramas normalizados para H3B-8800 en combinación con citarabina, azacitidina, decitabina, glasdegib, midostaurina y venetoclax en OCI-AML3. (B) Isobogramas normalizados para H3B-8800 en combinación con citarabina, azacitidina, decitabina, glasdegib, midostaurina y venetoclax en OCI-AML3\_R20µMC\_1.

El resto de las combinaciones ensayadas también mostraron efectos sinérgicos (véase la figura 40), resultando ser la combinación de H3B-8800 con venetoclax la más potente, ya que presentaba la mayoría de los valores de índice de combinación en rangos inferiores o iguales a 0,5, tanto en el modelo de LMA sensible como en el modelo resistente a citarabina.

Venetoclax ha mostrado eficacia en su uso combinado con otros inhibidores para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda. En efecto, está aprobado en combinación con bajas dosis de citarabina, o con los hipometilantes azacitidina o decitabina. Además, su combinación con otros inhibidores para el tratamiento de la LMA está siendo investigada en fase preclínica, tal es el caso de midostaurina o gilteritinib, mostrando beneficios claros en modelos preclínicos de la enfermedad <sup>124</sup>.

En resumen, si se aúnan los buenos resultados mostrados por venetoclax en la clínica, y los resultados prometedores del inhibidor de *splicing* H3B-8800, que está siendo evaluado para LMA, la combinación de ambos fármacos podría ser una buena estrategia terapéutica para evitar el desarrollo de resistencias a citarabina o superarlas cuando ya se hayan desarrollado.

### **4.1.3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DE LA COMBINACIÓN DEL INHIBIDOR DE *SPLICING*, H3B-8800, Y EL INHIBIDOR DE BCL-2, VENETOCLAX, EN MODELOS *EX VIVO* DE LA ENFERMEDAD**

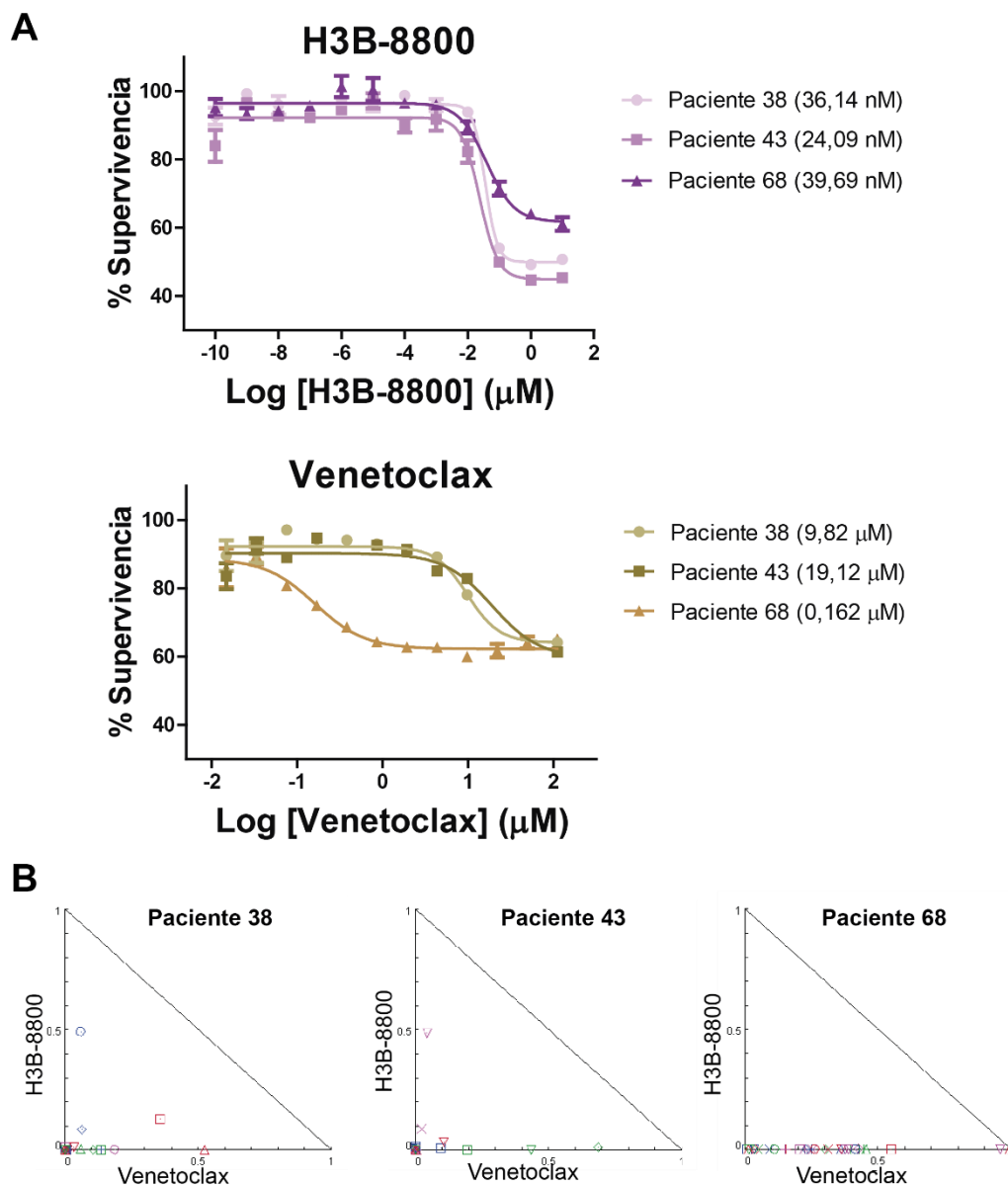
#### **4.1.3.1. La evaluación *ex vivo* del inhibidor de *splicing* H3B-8800 junto a venetoclax mostró efectos sinérgicos en muestras de pacientes de LMA**

Como se pudo observar en los modelos celulares *in vitro*, previamente descritos, la combinación de un inhibidor de *splicing*, como H3B-8800, con el inhibidor de Bcl-2, venetoclax, mostró un aumento en la actividad antileucémica tanto en contexto de sensibilidad como de resistencia farmacológica a citarabina (observe la figura 40).

El siguiente paso, por tanto, fue evaluar los efectos farmacológicos de dichos compuestos en monoterapia (consulte la figura 41A) o en combinación (véase la figura 41B) en muestras *ex vivo* de tres pacientes con LMA (pacientes 38, 43 y 68), mostrando efectos de sinergia fuerte ( $CI \leq 0,5$ ) y citotoxicidad en cada caso.

Los valores de IC50 para H3B-8800 y para venetoclax se localizaron en el rango nanomolar y micromolar respectivamente, mostrándose en línea con los resultados obtenidos en los modelos *in vitro* de la enfermedad en experimentos anteriores.

Además, tras la evaluación de las combinaciones se observaron efectos de sinergia fuerte en la mayoría de las dosis combinatorias ensayadas en cada uno de los pacientes cuyas muestras fueron sometidas a estudio.



**Figura 41. La combinación de H3B-8800 con venetoclax mostró efectos de sinergia fuerte *ex vivo* en muestras de tres pacientes de LMA.**

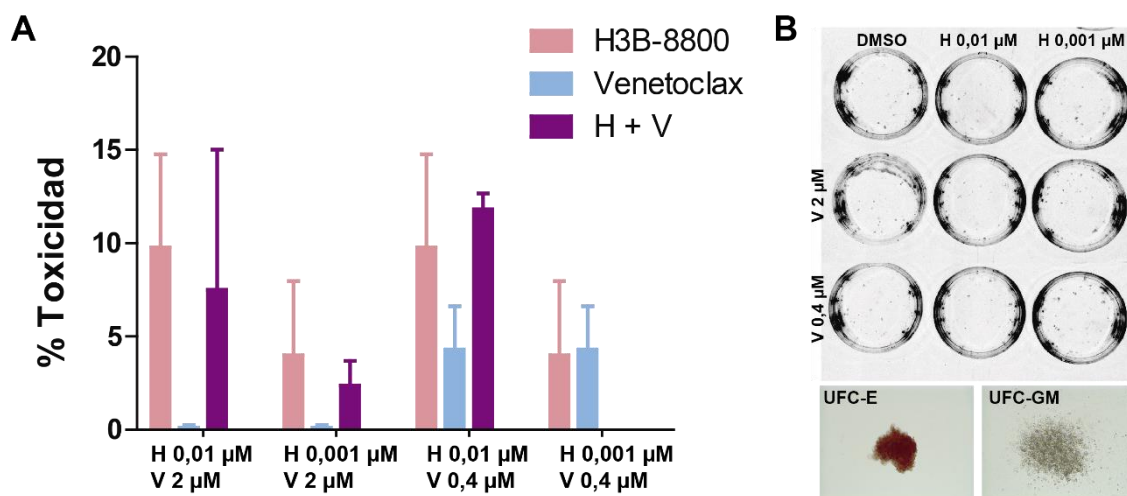
(A) Curvas de dosis-respuesta para H3B-8800 y venetoclax en muestras *ex vivo* de tres pacientes de LMA. (B) Isobogramas normalizados para H3B-8800 en combinación con venetoclax en muestras *ex vivo* de tres pacientes de LMA.

#### 4.1.3.2. La combinación del inhibidor de *splicing* H3B-880 con venetoclax mantuvo la seguridad frente a progenitores mieloides de donantes sanos

Adicionalmente, una vez demostrado el efecto antileucémico de la combinación, se testó si dicha combinación podía afectar al crecimiento de progenitores mieloides CD34+ provenientes de donantes sanos.

Para ello, las células CD34+ se aislaron por separación celular con anticuerpos marcados magnéticamente y se cultivaron en medio metilcelulosa suplementado para favorecer el crecimiento de progenitores hematopoyéticos y complementado con dosis combinadas.

Las unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E) y granulocíticas – monocíticas (UFC-GM) de tres donantes sanos (D16 – D18) fueron contadas a día 13 – 14 de incubación y se pudo observar que las mismas dosis de H3B-8800 o de venetoclax que sí mostraban efectos citotóxicos en muestras *ex vivo* de pacientes de LMA, no mostraban efectos citotóxicos en los progenitores de médula ósea (véase la figura 42).



**Figura 42. La combinación de H3B-8800 (H) con venetoclax (V) mostró su seguridad en progenitores mieloides CD34+ de tres donantes sanos.**

(A) Porcentajes de toxicidad relativa al control con DMSO (n =3). (B) Unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E) y granulocíticas – monocíticas (UFC-GM) presentes en las dosis control (DMSO), H3B-8800 0,01 μM, H3B-8800 0,001 μM, venetoclax 2 μM, venetoclax 0,4 μM o sus respectivas combinaciones.

Además, en este caso la combinación de los dos fármacos no potenciaba su toxicidad, de modo que se podía apreciar que la toxicidad asociada a la combinación era inferior a la suma de la toxicidad que se apreciaba cuando cada uno de los fármacos se empleaban en monoterapia.

En resumen, el uso de H3B-8800, venetoclax, o su combinación, mostraba efectividad citotóxica en muestras *ex vivo* de pacientes con LMA, mientras que no generaba toxicidad *ex vivo* en células CD34+ progenitoras mieloides de donantes sanos. Por tanto, la combinación de estos dos fármacos mostró ser una combinación segura y efectiva para el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide aguda.

## **4.2. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA FARMACOLÓGICA A INHIBIDORES TIROSINA QUINASA**

### **4.2.1. ESTUDIO DE LA RESISTENCIA FARMACOLÓGICA A LOS INHIBIDORES DE FLT3**

#### **4.2.1.1. Tres de cada cinco pacientes de LMA con mutaciones en FLT3 perdieron la respuesta al tratamiento con TKI a los pocos meses de haber iniciado el tratamiento**

Con el fin de identificar los mecanismos de resistencia desarrollados a los inhibidores tirosina quinasa en LMA, se realizó la búsqueda en las bases de datos de registro del Hospital 12 de Octubre de todos los pacientes de LMA que hubieran recibido algún tratamiento con estos inhibidores tras el diagnóstico de la enfermedad.

Entre los años 2008 y 2016, cinco pacientes de LMA con mutaciones en el gen *FLT3* recibieron terapia basada en algún TKI en el Hospital 12 de Octubre, y tras unos meses, tres de ellos desarrollaron resistencia farmacológica (pacientes 3, 12 y 76, consulte los detalles en el anexo 2), perdiendo de este modo la respuesta al tratamiento dirigido frente al receptor tirosina quinasa FLT3.

El paciente 76, fue diagnosticado a los 71 años de LMA, subtipo M1 de la clasificación de la FAB, presentando una mutación puntual en el dominio yuxtamembrana (JMD) del gen *FLT3* (L576P). La muestra de diagnóstico de este paciente se estudió por secuenciación de exoma completo (WES), por el servicio asistencial de Hematología Traslacional del Hospital 12 de Octubre, y se confirmó la ausencia de mutaciones en genes de interés que estuvieran relacionados con las principales vías de señalización subyacentes a FLT3 (rutas de señalización ERK1/2, PI3K/AKT y JAK/STAT5).

El paciente fue entonces incluido en el ensayo clínico PANOBINODARA (NCT00840346), que evaluaba la eficacia del inhibidor de las histonas deacetilasas, panobinostat, en pacientes de nuevo diagnóstico de LMA mayores de 65 años. Por desgracia, tras unos meses de tratamiento, el paciente presentó la recaída en la enfermedad. Como terapia alternativa, y dada la presencia de la mutación L576P en el gen *FLT3*, se le administró el inhibidor tirosina quinasa, sorafenib, en uso compasivo, tras la firma del consentimiento informado y la aprobación de su uso por la junta de revisión institucional del Hospital 12 de Octubre. A pesar de que el paciente mostró una buena respuesta inicial, la enfermedad progresó, el paciente volvió a presentar infiltración blástica en sangre periférica, y finalmente falleció tras 33 meses desde el diagnóstico de la enfermedad.

Por otro lado, el paciente 3 fue diagnosticado también de LMA subtipo M1 de la clasificación de la FAB, a los 63 años, con otra mutación puntual en el mismo residuo del dominio yuxtamembrana de *FLT3* (L576Q) que presentaba el paciente 76. Tras varias líneas de tratamiento terapéutico, el paciente recibió sorafenib en uso compasivo, tras la firma del consentimiento informado y la aprobación de su uso por la junta de revisión institucional del Hospital 12 de Octubre, logrando mantener la respuesta hematológica durante 5 meses. Posteriormente, los estudios realizados en médula ósea mostraron la reaparición de signos de la enfermedad, la consecuente recaída y el paciente falleció tras 22 meses desde el diagnóstico de la enfermedad.

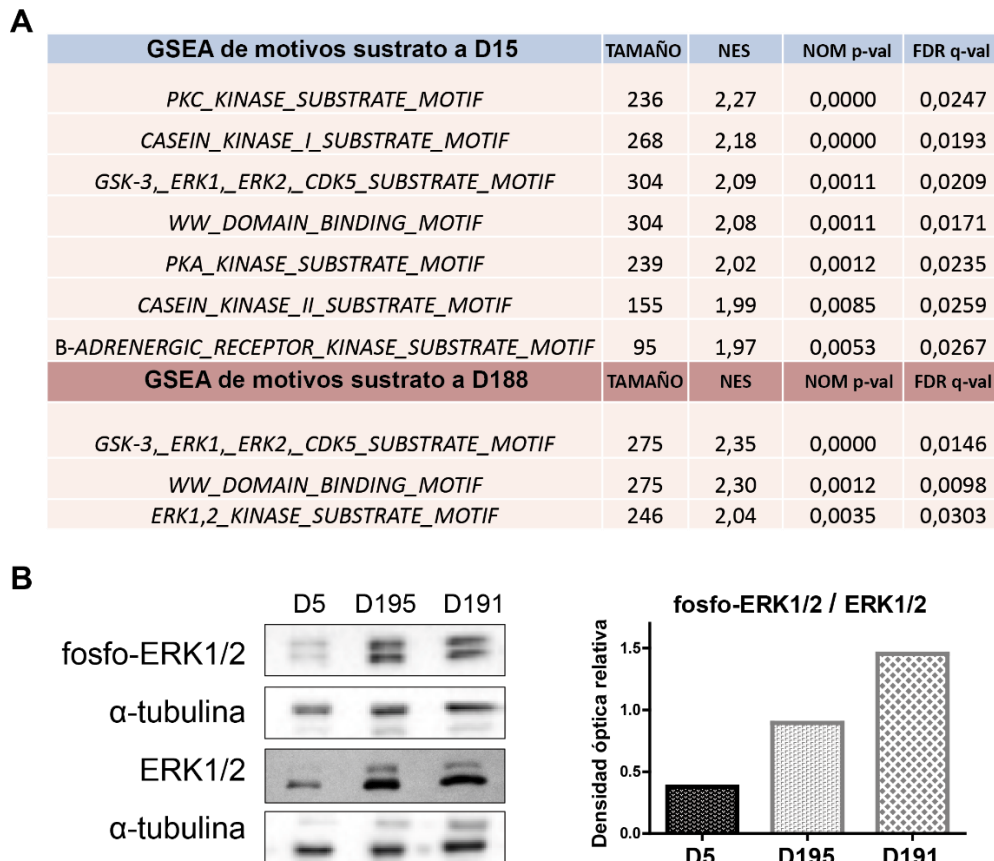
Por último, la paciente 12 fue diagnosticada de LMA subtipo M2 de la clasificación de la FAB, a los 36 años, presentando mutaciones ITD en el gen de *FLT3*. Fue reclutada para entrar en un ensayo clínico que probaba la eficacia de midostaurina al diagnóstico en pacientes con mutaciones en *FLT3* (NCT00651261). Sin embargo, a pesar de mostrar una respuesta inicial prometedora, la paciente recayó 5 meses después de comenzar el tratamiento y falleció pasados 8 meses desde el diagnóstico de la enfermedad.

#### **4.2.1.2. La ruta ERK1/2 estaba sobre-activada en los pacientes de LMA con *FLT3* mutado tratados con inhibidores tirosina quinasa**

Para evaluar las posibles alteraciones adquiridas durante el desarrollo de la resistencia farmacológica al inhibidor tirosina quinasa, dos muestras de células mononucleadas de sangre periférica del paciente 76 (a día 15 y día 188 de tratamiento con sorafenib) fueron analizadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem, tras el enriquecimiento de los fosfo-péptidos de las muestras por IMAC. Con los datos obtenidos tras el estudio, se llevó a cabo un análisis de los motivos enriquecidos en las muestras que fueran sustrato de quinasas usando el programa MaxQuant. De este modo, se podía predecir qué quinasas eran responsables de la fosforilación de los fosfositios identificados en las muestras.

Así, el análisis reveló la presencia de siete motivos sustrato enriquecidos al comienzo del tratamiento (día 15) y tres motivos sustrato enriquecidos tras el tratamiento sostenido con sorafenib (día 188). Los motivos sustrato de la quinasa ERK1/2 fueron los únicos identificados en el día 188 de tratamiento, pero no al día 15, indicando así un aumento persistente en la actividad de la quinasa ERK1/2 durante el tratamiento con el TKI sorafenib (véase la figura 43A).

Tras ello, se analizaron por electrotransferencia los niveles de expresión de la proteína fosfo-ERK1/2 en tres muestras diferentes de PBMC del paciente 76 (a días 5, 191 y 195 de tratamiento con sorafenib), encontrando que los niveles de fosforilación de ERK1/2 tras 6 meses de tratamiento continuado con sorafenib (días 191 y 195) eran significativamente mayores que los encontrados en la muestra que se había recogido tras sólo 5 días de tratamiento (día 5) (consulte la figura 43B).



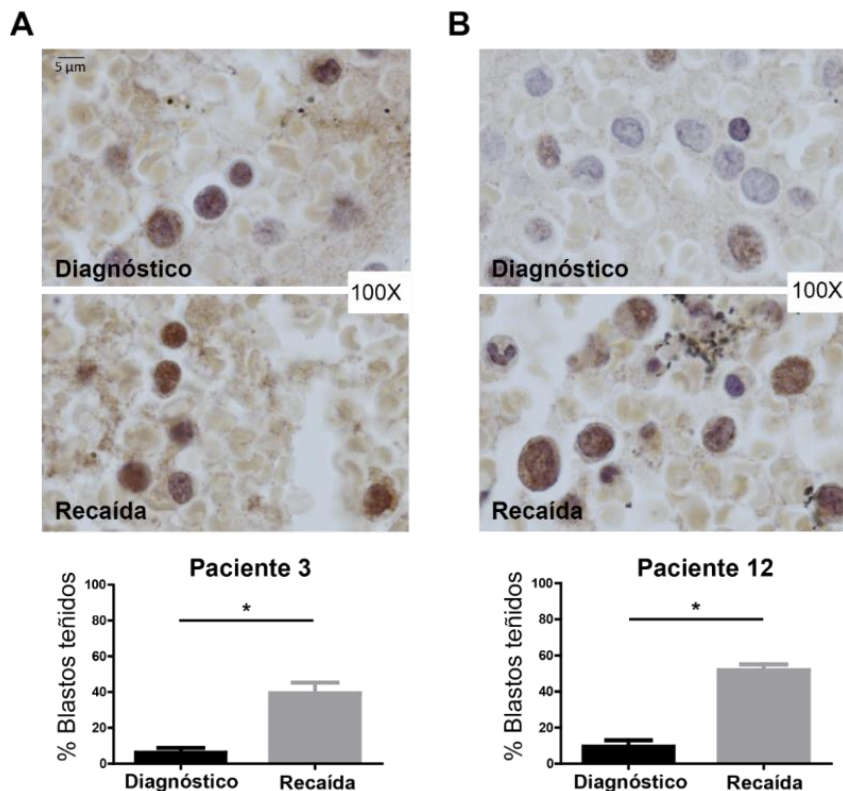
**Figura 43. La proteína ERK1/2 presentaba sobre-activación tras el tratamiento continuado con TKI en pacientes de LMA que presentaban mutaciones en *FLT3*.**

(A) Diagrama de Venn de los motivos sustrato enriquecidos en dos momentos de tratamiento del paciente 76, a día (D) 15 y 188 de tratamiento con sorafenib. (B) Niveles de fosfo-ERK1/2 en muestras del paciente 76 a diferentes días de tratamiento con sorafenib analizados por electrotransferencia.

Para corroborar la activación de ERK1/2 como un posible mecanismo de resistencia a TKI, se analizaron los niveles de expresión de la proteína fosfo-ERK1/2 en los otros dos pacientes de LMA que habían sido tratados con algún inhibidor tirosina quinasa y que habían mostrado resistencia tras recibir el tratamiento en los años de búsqueda (2008 a 2016).

En estos dos pacientes, por falta de disponibilidad de muestra para realizar los estudios fosfo-proteómicos, se estudió también la expresión de la proteína fosfo-ERK1/2, pero en este caso, mediante inmunohistoquímica de coágulos de médula ósea embebidos en parafina. Se analizaron las muestras al diagnóstico y en la recaída en la enfermedad tras haber recibido el tratamiento con TKI (sorafenib o midostaurina).

De este modo, el porcentaje de blastos teñidos (por la presencia de fosfo-ERK1/2) fue calculado antes y después del tratamiento. Así, se observaron diferencias significativas en la expresión de la proteína ERK1/2 fosforilada en el paciente 3 (véase la figura 44A) y la paciente 12 (véase la figura 44B), quienes mostraban mayores niveles de la proteína fosforilada en el momento de la recaída en comparación a sus respectivos momentos de diagnóstico. Estos resultados corroboraban la activación de ERK1/2 en la resistencia farmacológica a TKI observada en el paciente 76 mediante los análisis fosfoproteómicos.



**Figura 44. La proteína ERK1/2 estaba sobre-activada tras el tratamiento continuado con TKI en pacientes de LMA con FLT3 mutado.**

(A) Estudios de inmunohistoquímica de tejidos parafinados de los niveles de fosfo-ERK1/2 al diagnóstico y en la recaída del paciente 3 tras el tratamiento con sorafenib, (B) y del paciente 12 tras el tratamiento con midostaurina. \*  $P \leq 0,05$ . Barra de escala: 5  $\mu\text{m}$ .

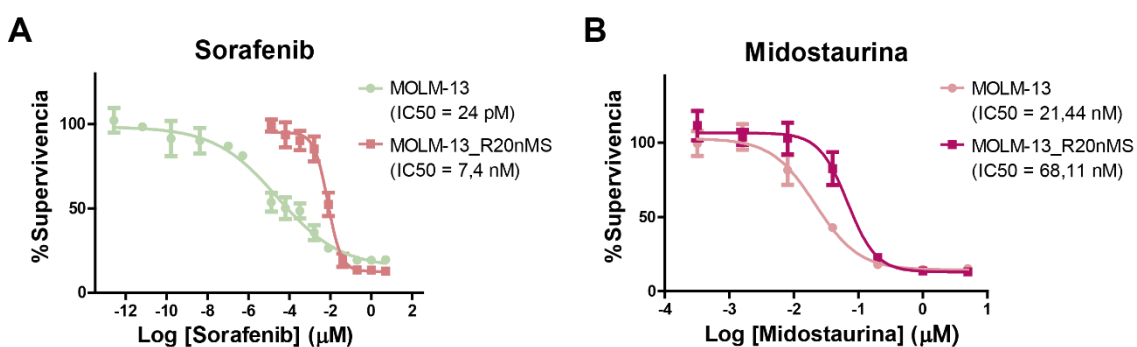
#### 4.2.1.3. La vía ERK1/2 presentó mayor activación tras el desarrollo de resistencia a TKI *in vitro*

En base a los resultados previos presentados, el siguiente paso fue probar si la fosforilación de ERK1/2 podría estar inducida por el tratamiento sostenido con TKI también en un modelo de enfermedad *in vitro*.

Para estudiar los mecanismos de resistencia farmacológica a TKI, se empleó la línea MOLM-13, que expresaba de manera heterocigota las formas *wildtype* y mutada (mutaciones ITD) en el gen *FLT3*. Mediante la exposición sostenida a dosis crecientes de sorafenib, durante aproximadamente dos meses, se comprobó que las células adquirieron resistencia farmacológica al mismo.

Esta nueva línea resistente (MOLM-13\_R20nMS) resultó ser aproximadamente 300 veces menos sensible a sorafenib que la línea parental farmacológicamente sensible MOLM-13, la cual presentaba un valor de IC<sub>50</sub> en el rango picomolar (las curvas dosis-respuesta y valores de IC<sub>50</sub> están mostrados en la figura 45A).

Tras ello, se estudiaron los efectos del otro inhibidor tirosina quinasa, midostaurina, en ambas líneas celulares, y se observó que existía resistencia cruzada en la línea MOLM-13\_R20nMS, pero que se mantenía la sensibilidad al fármaco en la línea parental MOLM-13, al igual que ocurría con sorafenib. En este caso, el valor de IC<sub>50</sub> se situaba en el rango nanomolar (véase la figura 45B).

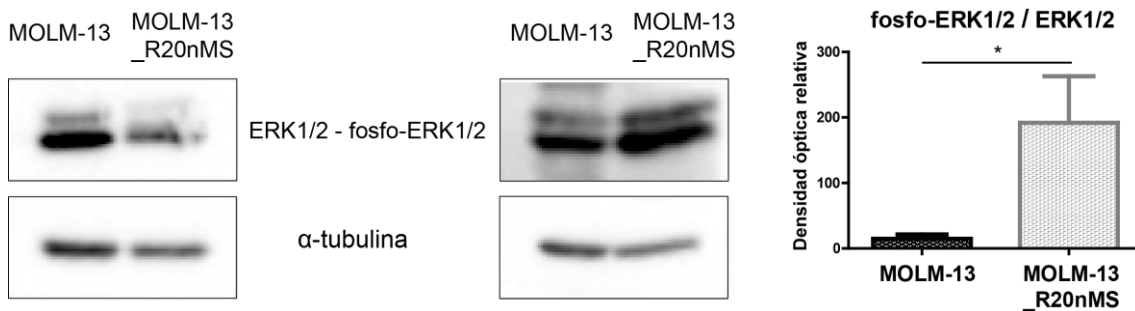


**Figura 45. Generación de una línea resistente a TKI *in vitro*.**

(A) Curvas de dosis – respuesta para sorafenib en las líneas celulares sensible (MOLM-13) o resistente a TKI (MOLM-13\_R20nMS). (B) Curvas de dosis – respuesta para midostaurina en las líneas celulares sensible (MOLM-13) o resistente a TKI (MOLM-13\_R20nMS).

Por otro lado, los análisis por electrotransferencia mostraron que la nueva línea generada, MOLM-13\_R20nMS, presentaba mayor expresión de fosfo-ERK1/2 que su parental MOLM-13 (observe la figura 46) de manera estadísticamente significativa, de modo similar a los resultados encontrados *ex vivo* en los pacientes 76 (véase la figura 43B), 3 (figura 44A) y 12 (figura 44B). Consecuentemente, se demostraba que el tratamiento sostenido con un inhibidor tirosina quinasa *in vitro* podía acabar generando resistencia adquirida al mismo en un contexto de leucemia mieloide aguda.

Diversos autores han descrito en sus estudios la adquisición de mutaciones en *FLT3* u otros genes relacionados a éste durante el desarrollo de resistencias a distintos inhibidores tirosina quinasa <sup>9,87,108,131,165</sup>. Para evaluar si esto podía estar ocurriendo en la línea celular resistente a TKI generada, se realizó la secuenciación del ADN de ambas líneas MOLM-13 y MOLM-13\_R20nMS usando un panel customizado para enfermedades mieloides, y se descartó la adquisición de mutaciones en la nueva línea resistente, MOLM-13\_R20nMS, en cualquiera de los genes contenidos en el panel (consulte el anexo 4 para más información).



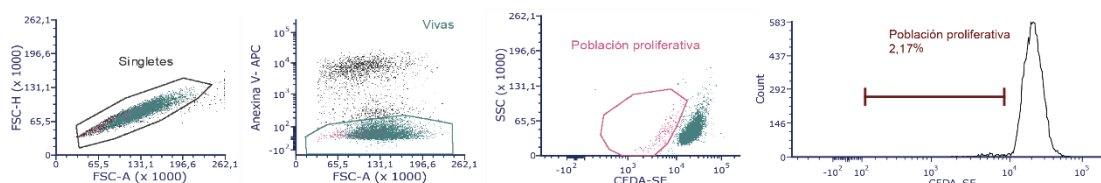
**Figura 46. La relación de fosfo-ERK1/2 / ERK1/2 medida por electrotransferencia se mostró elevada en MOLM-13\_R20nMS respecto a MOLM-13.**

La intensidad de señal de cada banda se normalizó respecto al valor correspondiente recogido para α-tubulina. \*  $P \leq 0,05$ .

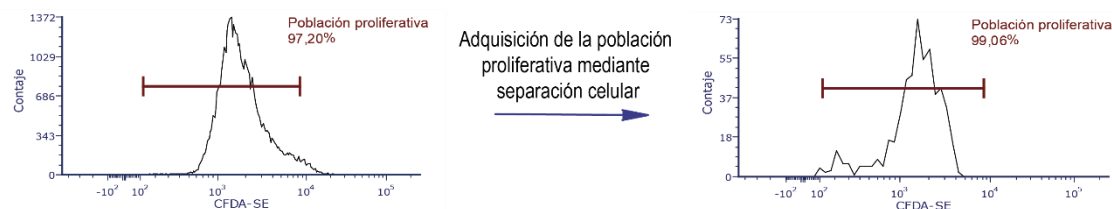
Para validar mediante otra técnica adicional la activación de ERK1/2 como posible mecanismo común de resistencia a los inhibidores tirosina quinasa, las células MOLM-13 se tiñeron con el reactivo CFDA-SE, el cual se une covalentemente a compuestos del citoplasma celular, creando así una herramienta que permite visualizar las divisiones celulares durante un periodo de hasta 8 días de manera estable.

De este modo, las células marcadas fueron expuestas a 5  $\mu$ M de sorafenib durante 48 horas (consulte la figura 18). Así, la población farmacológicamente resistente, que hubiera sobrevivido ante la presencia del fármaco y, además, se hubiera dividido en ese periodo de tiempo (CFDA-SE+ y Anexina 5-), fue separada usando el equipo de citometría *FACSaria™ Fusion Cell Sorter*, siguiendo una estrategia de exclusión de singletes y células muertas (véase la figura 47).

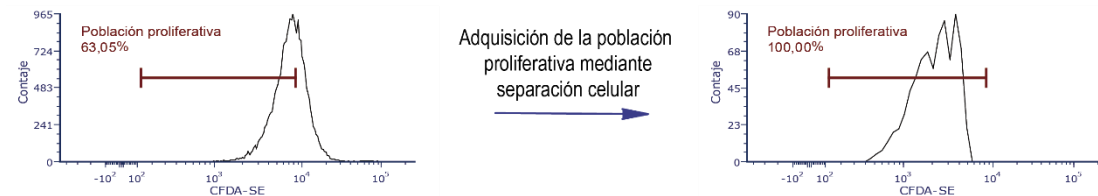
Estrategia de rastreo y análisis (basado en un cultivo sin tratamiento tras 24h de incubación con CFDA-SE)



Cultivo sin tratamiento tras 48h de incubación con CFDA-SE



Cultivo tratado con sorafenib tras 48h de incubación con CFDA-SE

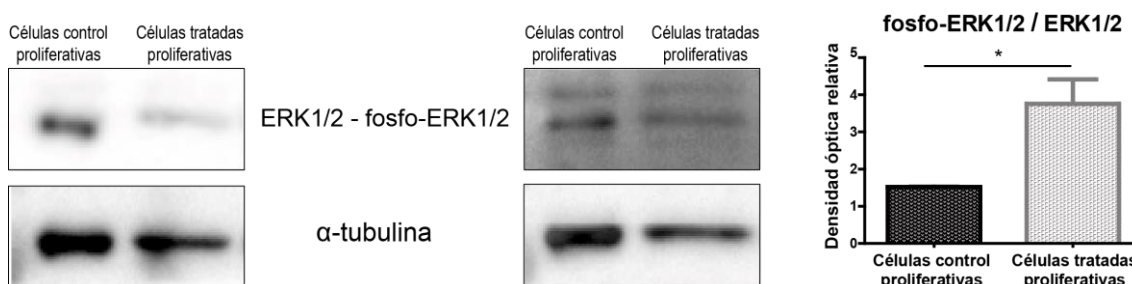


**Figura 47. Gráficas representativas del flujo de trabajo para la separación celular.**

La estrategia de rastreo empleada se basó en la exclusión de singletes y células muertas. Siempre que fue posible, se analizó el perfil de una población de interés de como mínimo 10000 células.

Se recogieron como mínimo  $10^4$  células de cada condición, se extrajo su contenido proteico y se compararon los niveles de fosforilación de la proteína ERK1/2 en las células proliferativas y viables (CFDA-SE+ y Anexina 5-), MOLM-13, tratadas con sorafenib (células tratadas proliferativas) o tratadas con el vehículo DMSO (células control proliferativas) por electrotransferencia.

En esta nueva comparativa se observó que al igual que ocurría en la línea celular MOLM-13\_R20nMS, los niveles de fosforilación de ERK1/2 estaban incrementados de manera estadísticamente significativa en el momento de adquisición de la resistencia farmacológica al inhibidor tirosina quinasa sorafenib (observe la figura 48), incluso habiendo sido las células expuestas al fármaco durante un periodo de tiempo más estrecho que para la línea celular resistente generada.



**Figura 48. La vía ERK1/2 se encontraba sobre-activada tras la exposición sostenida a TKI *in vitro*.**

Los niveles de fosfo-ERK1/2 / ERK1/2 de los cultivos proliferativos MOLM-13 teñidos con CFDA-SE y separados tras 48 horas de tratamiento con sorafenib (células tratadas proliferativas) o con el vehículo DMSO (células control proliferativas) se analizaron mediante electrotransferencia y se normalizaron respecto a los valores correspondientes de α-tubulina. \* P ≤ 0,05.

#### **4.2.2. EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA DE RESISTENCIA ERK1/2 EN MONOTERAPIA Y EN COMBINACIÓN EN MODELOS *IN VITRO* DE LA ENFERMEDAD CON *FLT3* MUTADO O SALVAJE**

##### **4.2.2.1. Trametinib fue efectivo y mostró efectos sinérgicos con inhibidores tirosina quinasa en las células sensibles con *FLT3* mutado, MOLM-13, y resistentes a TKI, MOLM-13 R20nMS**

La aparente sobre-activación de la ruta ERK1/2 en las muestras de pacientes de LMA resistentes a TKI y modelos *in vitro* de la enfermedad, generó la hipótesis de si los pacientes con LMA podrían beneficiarse de alguna terapia basada en la inhibición de ERK1/2.

El inhibidor de MEK1/2, trametinib, fue el primer inhibidor de la proteína que fue aprobado para su uso en monoterapia en melanoma en 2013<sup>122</sup>, y había mostrado previamente su eficacia en SMD, LMA y LMMC, especialmente en pacientes con mutaciones en *RAS*<sup>123</sup>.

Por ello, se testó si trametinib, el inhibidor de la quinasa efectora sobre ERK1/2, MEK1/2, podía ser efectivo frente a la línea sensible, MOLM-13, y también frente a la línea resistente a TKI generada, MOLM-13\_R20nMS.

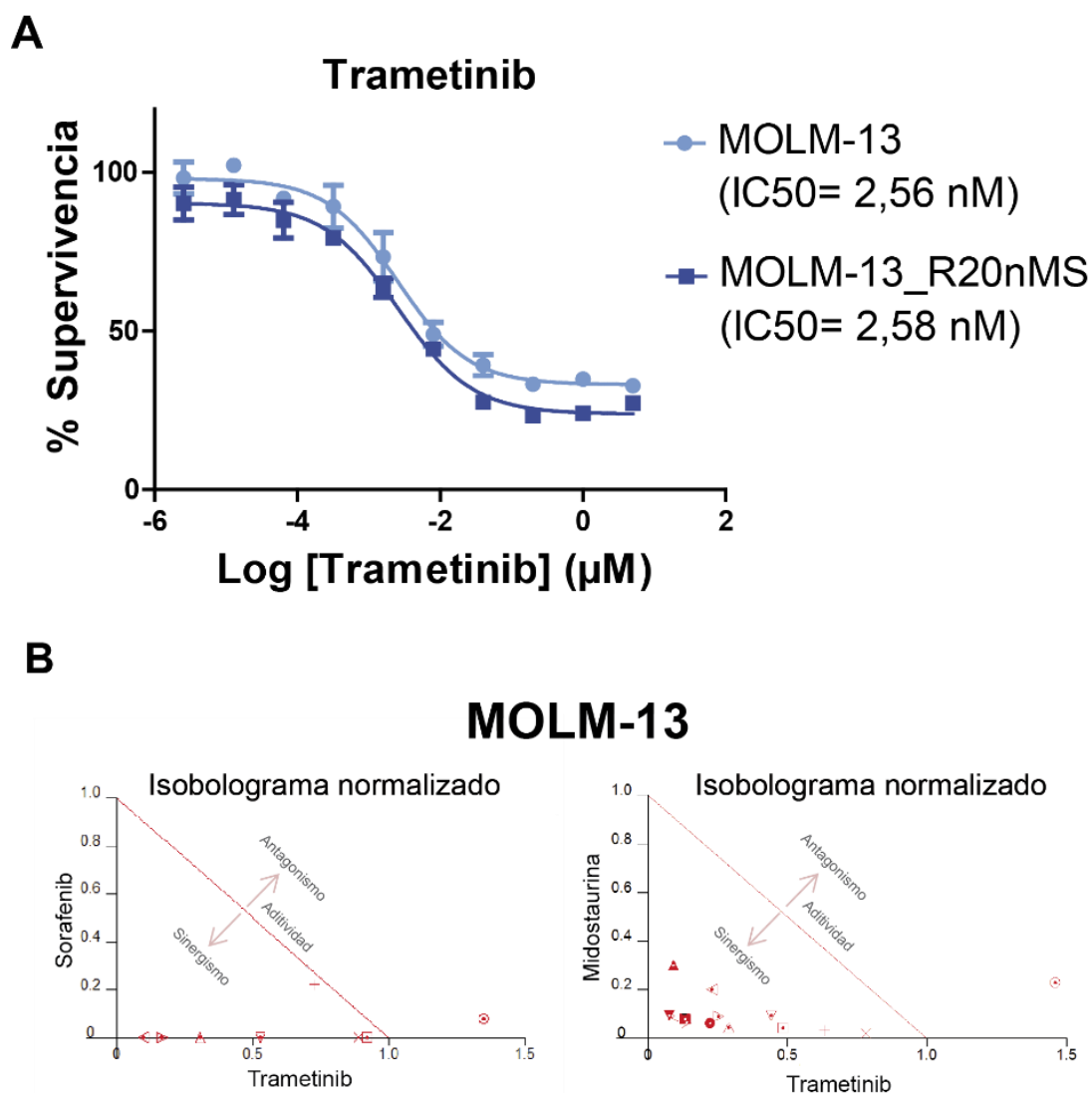
Así se pudo apreciar que ambas líneas mostraban resultados similares de sensibilidad farmacológica a trametinib, el cual inhibía eficazmente el crecimiento celular *in vitro* en ambos modelos con valores de IC50 en el rango nanomolar (IC50 MOLM-13 = 2,56 nM, IC50 MOLM-13\_R20nMS = 2,58 nM, véase la figura 49A).

Estos resultados indicaban que no existía resistencia cruzada entre trametinib y los inhibidores tirosina quinasa, sorafenib y midostaurina, en las líneas celulares testadas, y sugería que trametinib podría ser beneficioso en el contexto de células de LMA que presenten mutaciones en *FLT3*, e incluso en el caso de que muestren resistencia a TKI.

Además, como trametinib en combinación con TKI podría prevenir el desarrollo de resistencia a estos inhibidores, el siguiente objetivo fue determinar los efectos causados tras la combinación de trametinib con sorafenib o con midostaurina.

Así pues, se estudió el resultado de combinar diferentes dosis de trametinib (20 nM – 2,5 nM) (consulte la tabla 10) con dosis de sorafenib (5 nM – 5 fM), o midostaurina (40 nM – 1,25 nM) para determinar el valor de índice de combinación. Para ser más restrictivos en el estudio, sólo se consideraron como efectos sinérgicos los valores de CI pertenecientes al rango de sinergia fuerte ( $CI \leq 0,5$ ).

De esta manera, tras 48 horas de tratamiento simultáneo con la combinación de fármacos, se observaron efectos sinérgicos en ambas combinaciones farmacológicas (observe la figura 49B), indicando que la combinación de trametinib con cualquiera de los TKIs ensayados potenciaba la inhibición del crecimiento celular en la línea sensible MOLM-13, y que, en particular, la combinación de midostaurina con trametinib parecía la más potente, puesto que mostraba mayor cantidad de combinaciones con valor de  $CI \leq 0,5$ .

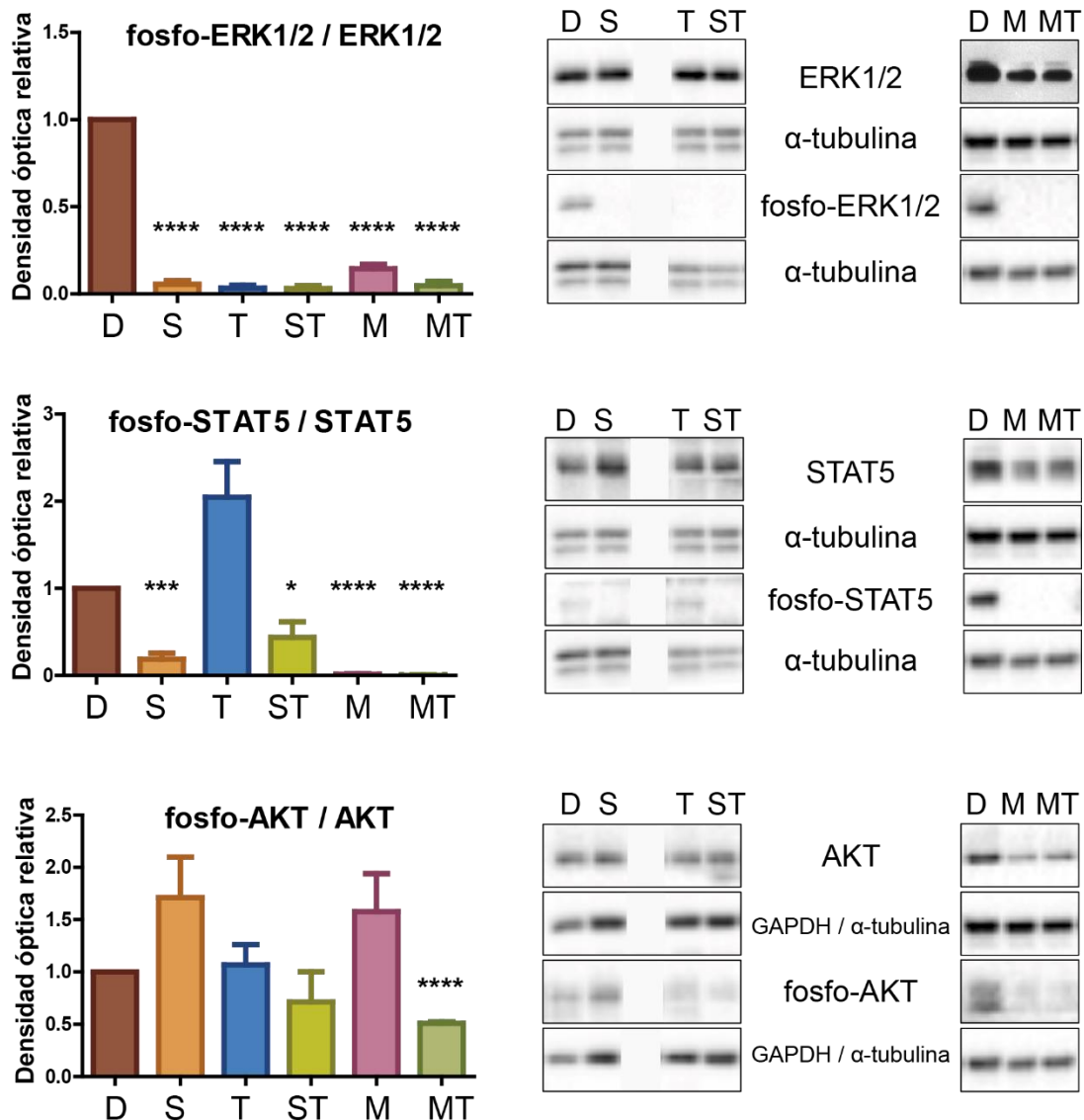


**Figura 49. Trametinib inhibió eficazmente el crecimiento celular de las células MOLM-13 y MOLM-13\_R20nMS y mostró sinergia con TKI.**

(A) Curvas de dosis-respuesta a trametinib en las células MOLM-13 sensibles y resistentes a TKI. (B) Isobogramas normalizados para trametinib en combinación con los TKIs sorafenib y midostaurina en las células MOLM-13.

#### **4.2.2.2. La combinación de midostaurina con trametinib mostró la mayor efectividad *in vitro* en la inhibición de las vías subyacentes a FLT3**

Para explorar los efectos derivados de los diferentes fármacos ensayados en las rutas de señalización subyacentes a FLT3 (vías ERK1/2, PI3K/AKT y JAK/STAT5), se estudió cómo afectaban los fármacos *in vitro* en monoterapia o en combinación en las células MOLM-13 a la fosforilación de dianas principales de dichas vías de señalización (consulte la figura 50).



**Figura 50.** Los niveles de ERK1/2, STAT5, AKT y de sus formas fosforiladas fueron analizados por electrotransferencia en el cultivo sensible a TKI, MOLM-13, tras el tratamiento en monoterapia o combinado con sorafenib, midostaurina o trametinib.

Se muestran las imágenes representativas de tres experimentos independientes, que mostraban resultados similares. \* P ≤ 0,05, \*\* P ≤ 0,01, \*\*\* P ≤ 0,001, \*\*\*\* P ≤ 0,0001.

Dado que se ha descrito un fenómeno de restablecimiento o rebote tras el tratamiento con TKI <sup>163</sup>, con una profunda inhibición inicial seguida de un incremento de fosforilación de ERK1/2 tras un periodo de incubación de 8-24 horas, se escogió para este estudio una ventana de tiempo inferior de 3 horas.

Los estudios de electrotransferencia mostraron una pérdida completa en la fosforilación de ERK1/2 tras el tratamiento con sorafenib, midostaurina, trametinib, y sus respectivas combinaciones (véase la figura 50).

De manera similar, los niveles de fosfo-STAT5 se presentaron significativamente disminuidos respecto al control con DMSO tras el tratamiento con sorafenib o midostaurina (figura 50). Por el contrario, el tratamiento con trametinib mostró un incremento no significativo en los niveles de fosfo-STAT5, pero su combinación con sorafenib o midostaurina revertía esta tendencia.

Por otro lado, los análisis de fosforilación de AKT mostraron que mientras que el tratamiento con trametinib no tenía efecto en los niveles de fosforilación de AKT, su combinación con los TKIs resultaba en una disminución de dichos niveles, que era significativa en el caso del tratamiento con la combinación de midostaurina y trametinib.

Para completar la caracterización de los efectos farmacológicos de los inhibidores tirosina quinasa, el inhibidor de MEK1/2, trametinib, y sus respectivas combinaciones, en la fosforilación de las principales dianas de las vías de señalización subyacentes a FLT3, se estudiaron también los efectos de estos en la línea MOLM-13\_R20nMS por electrotransferencia (véase la figura 51).

De esta manera, se observaron efectos similares a los apreciados en la línea sensible MOLM-13, lo cual demostraba que la combinación de midostaurina con trametinib parecía ser la más efectiva pues presentaba la capacidad de inhibir todas las rutas de señalización analizadas.

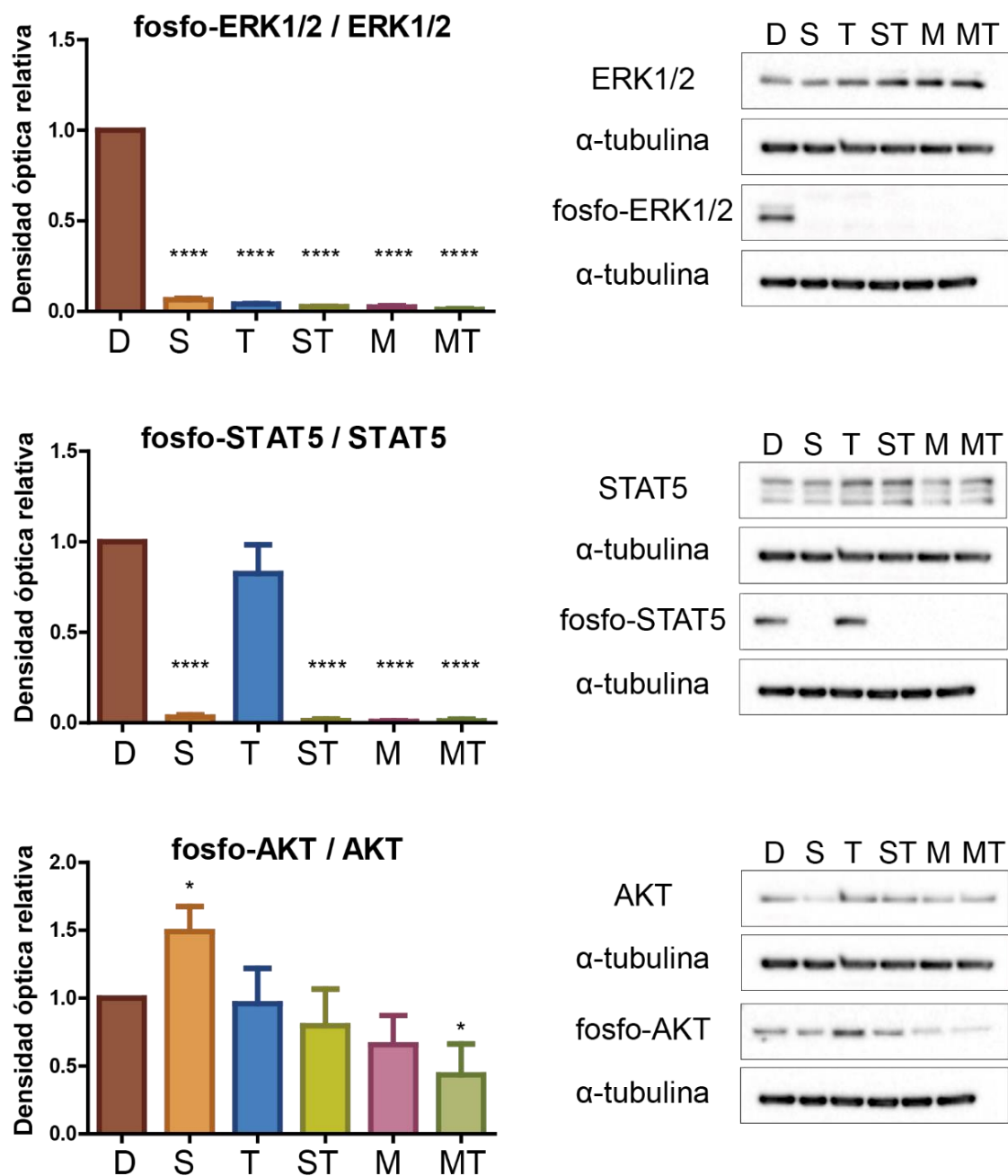
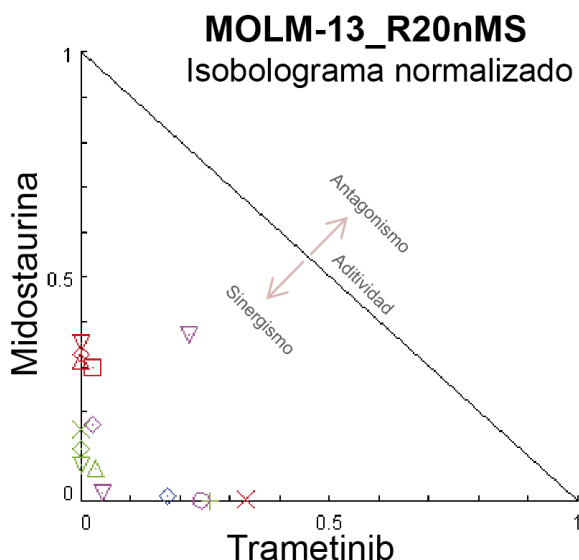


Figura 51. Los niveles de ERK1/2, STAT5, AKT y de sus formas fosforiladas se analizaron por electrotransferencia en el cultivo resistente, MOLM-13\_R20nMS, tras el tratamiento en monoterapia o combinado con sorafenib, midostaurina o trametinib.

Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes, que mostraban resultados similares. \* P ≤ 0,05, \*\* P ≤ 0,01, \*\*\* P ≤ 0,001, \*\*\*\* P ≤ 0,0001.

Puesto que la combinación de midostaurina con trametinib fue la que mejor funcionada inhibiendo las vías subyacentes a FLT3, tanto en el modelo de sensibilidad como en el modelo de resistencia, el siguiente paso fue evaluar si la eficacia y sinergia apreciada por la combinación en MOLM-13 (véase la figura 49B) se podría mantener en el modelo de resistencia MOLM-13\_R20nMS.

Así, de igual manera que en MOLM-13, se evaluaron los efectos de combinar trametinib (200 nM – 12,8 pM) con midostaurina (5 µM – 64 pM) en la línea resistente a TKI, MOLM-13\_R20nMS, apreciándose que los efectos citotóxicos de los fármacos se potenciaban cuando éstos se empleaban en combinación (ver figura 52), mostrando también valores correspondientes a un efecto de sinergia fuerte (CI ≤ 0,5).



**Figura 52. La sinergia de midostaurina con trametinib se mantuvo en la línea resistente a TKI, MOLM-13\_R20nMS.**

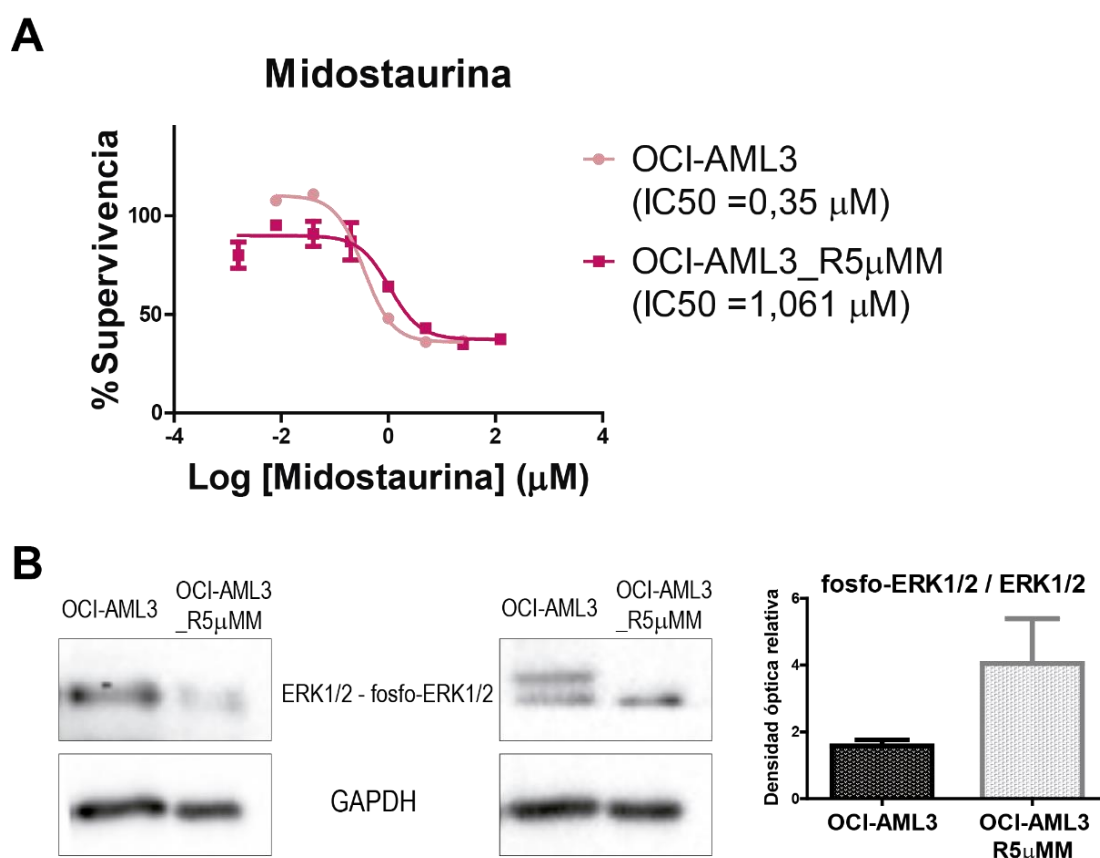
Isoblograma normalizado para trametinib en combinación con midostaurina en la línea celular MOLM-13\_R20nMS.

#### **4.2.2.3. La combinación de midostaurina y trametinib presentó sinergia *in vitro* en el contexto de LMA *wildtype* para FLT3**

Puesto que midostaurina presenta actividad frente a la forma mutada y *wildtype* del gen *FLT3*<sup>82,107</sup>, y que el receptor tirosina quinasa está sobre-expresado y, por tanto, activado de manera igual, independientemente de su estado mutacional, en prácticamente todos los tipos de LMA<sup>13,62,63,65</sup>, su combinación con trametinib podría resultar prometedora como tratamiento para la LMA.

Por ello, en primer lugar, se estudió si la fosforilación de ERK1/2 podría estar también inducida por el tratamiento sostenido con TKI *in vitro* en la línea celular *wildtype* para *FLT3* OCI-AML3. Para estudiarlo, las células OCI-AML3 se trataron con dosis crecientes de midostaurina durante un periodo de 3 semanas, hasta generar un modelo celular que presentara resistencia farmacológica adquirida, OCI-AML3\_5 $\mu$ MM (véase la figura 53A).

Los análisis realizados por electrotransferencia en esta nueva línea resistente a TKI, OCI-AML3\_5 $\mu$ MM, mostraron que al igual que ocurría con la línea resistente a TKI con fondo genético mutacional para *FLT3*, MOLM-13\_R20nMS (observe la figura 46), esta línea *wildtype* presentaba mayor expresión de fosfo-ERK1/2 que su línea parental OCI-AML3 (véase figura 53B).

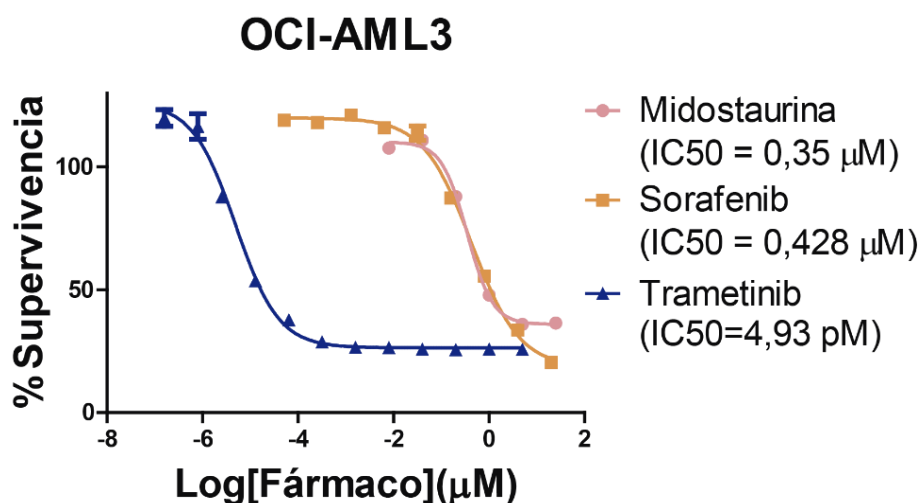


**Figura 53. Los niveles de fosfo-ERK1/2 también se vieron aumentados en el contexto de la resistencia a TKI en el fondo genético *wildtype* para *FLT3*.**

(A) Curvas de dosis-respuesta para midostaurina en las líneas sensible, OCI-AML3, y resistente a midostaurina, OCI-AML3\_R5 $\mu$ MM. (B) Los niveles proteicos de fosfo-ERK1/2 / ERK1/2 medidos por electrotransferencia en los cultivos sensibles y resistentes OCI-AML3. La intensidad de cada banda se normalizó al correspondiente valor de GAPDH.

Estos resultados, en definitiva, demostraban la utilidad de la cuantificación de fosfo-ERK1/2 como un biomarcador de la respuesta al tratamiento con inhibidores de FLT3 independientemente del estado mutacional del gen.

En este nuevo contexto genético, se evaluó probar si las eficacias observadas en MOLM-13 (consulte las figuras 45A, 45B, 49A), en monoterapia con los inhibidores tirosina quinasa, midostaurina y sorafenib, y con el inhibidor de MEK1/2, trametinib, se mantenían en la línea OCI-AML3, y que, de algún modo, pudieran ayudar también en la prevención de resistencias ante la ausencia de mutaciones en *FLT3*. Las curvas de dosis-respuesta de los tres fármacos mostraron una gran efectividad en monoterapia en todos los casos (véase la figura 54).



**Figura 54.** Los inhibidores tirosina quinasa, midostaurina y sorafenib, y el inhibidor de MEK1/2, trametinib, mantuvieron la eficacia en un contexto genético *FLT3 wildtype*.

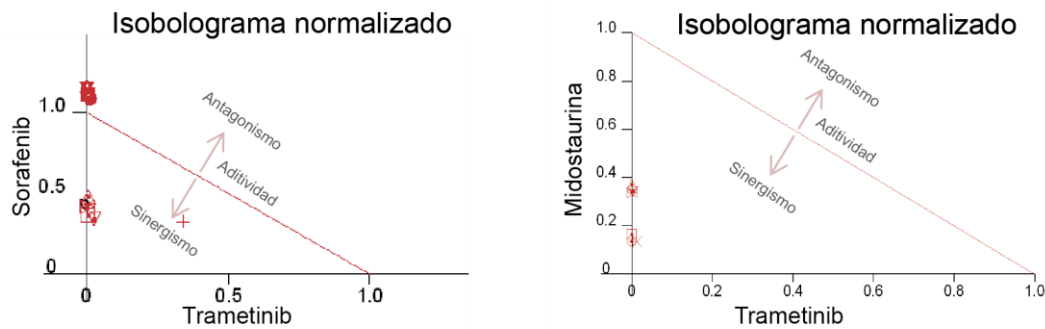
Curvas de dosis-respuesta para midostaurina, sorafenib y trametinib en OCI-AML3.

Tras ello, se probaron de nuevo las combinaciones de sorafenib o midostaurina con trametinib en la línea con fondo genético *wildtype* para *FLT3* (OCI-AML3), las cuales mostraron una gran efectividad en ambos casos (véase la figura 55).

De nuevo, destacó la combinación de trametinib con midostaurina por la presencia de mayor número de combinaciones con valor de índice de combinación  $\leq 0,5$ .

Estos resultados ponían de manifiesto que el tratamiento con un inhibidor de FLT3 podría ser igualmente efectivo ante la ausencia de mutaciones en el gen, y que, además, la efectividad del inhibidor de MEK1/2 no se encontraba influida por el estado mutacional del gen *FLT3*.

## OCI-AML3



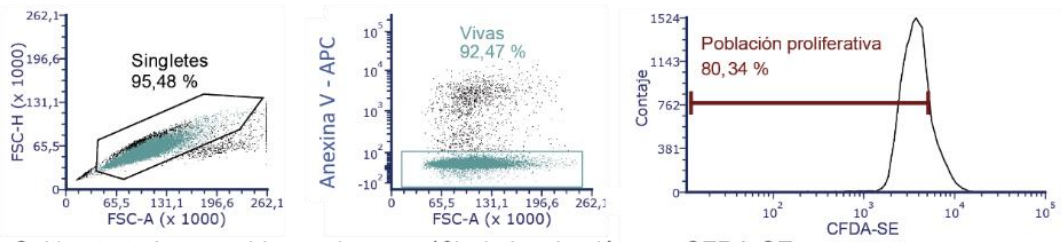
**Figura 55. La combinación de sorafenib o midostaurina con trametinib mostró sinergia fuerte en modelos *in vitro* de LMA con *FLT3 wildtype*.**

Isobologramas normalizados para la combinación de trametinib con los TKIs sorafenib o midostaurina en las células *FLT3 wildtype* OCI-AML3.

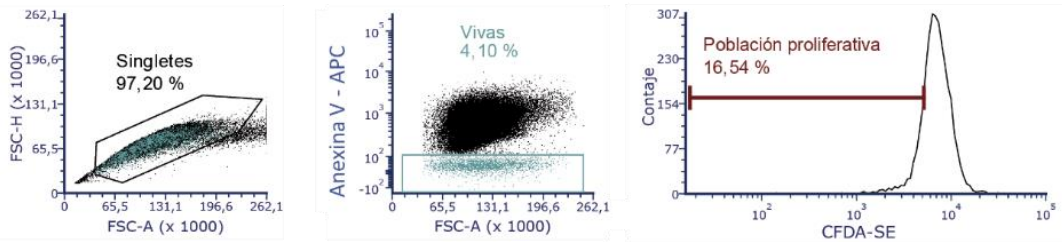
Para estudiar el posible papel de la inhibición de MEK1/2 en la prevención de la aparición de resistencia adquirida a TKI en un fondo genético *wildtype* para *FLT3*, se examinaron las células resistentes tras el tratamiento sostenido con midostaurina, trametinib o su combinación durante 48 horas *in vitro* en las células OCI-AML3.

De esta manera, repitiendo el planteamiento experimental de la figura 18, las células proliferativas y vivas (CFDA-SE+ y Anexina 5-) mostraron una menor supervivencia tras el tratamiento combinado de fármacos *versus* el tratamiento con los fármacos empleados en monoterapia (figura 56).

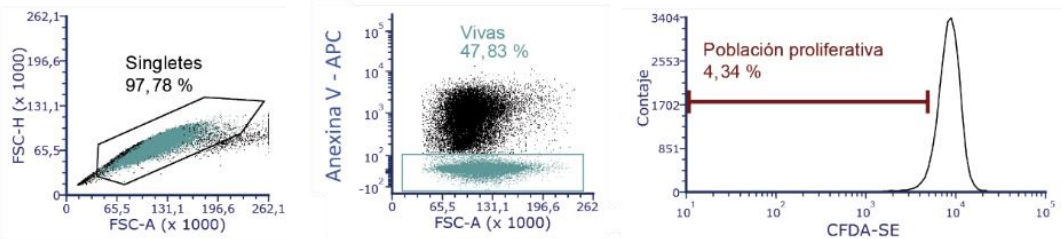
**Cultivo sin tratamiento tras 48h de incubación con CFDA-SE**



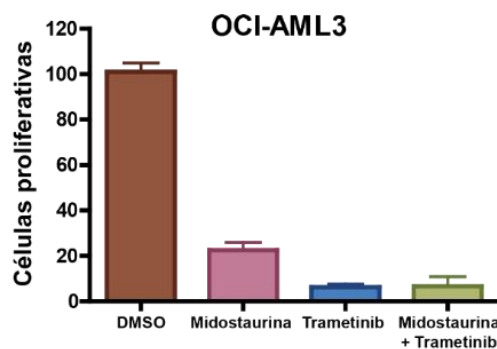
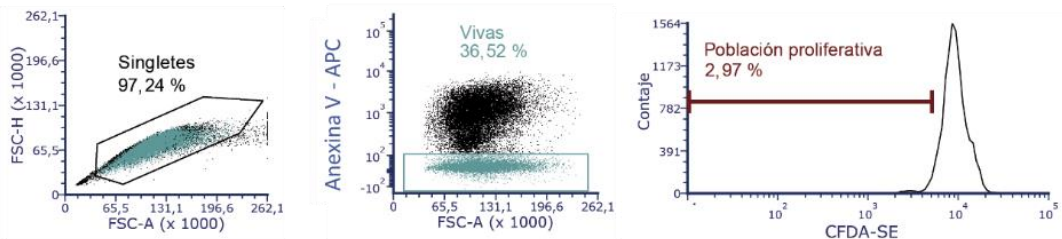
**Cultivo tratado con midostaurina tras 48h de incubación con CFDA-SE**



**Cultivo tratado con trametinib tras 48h de incubación con CFDA-SE**



**Cultivo tratado con midostaurina y trametinib tras 48h de incubación con CFDA-SE**



**Figura 56. La combinación de midostaurina y trametinib demostró ser beneficiosa en el contexto de resistencia a TKI con *FLT3 wildtype*.**

Gráficas representativas de los experimentos de separación de células OCI-AML3 proliferativas y viables después del tratamiento con midostaurina, trametinib o su combinación. La estrategia de separación se basó en la exclusión de singletes y células muertas. Cuando fue posible, se analizaron 10000 células de interés como mínimo.

### 4.2.3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DE LA COMBINACIÓN DEL INHIBIDOR DE FLT3, MIDOSTAURINA, CON EL INHIBIDOR DE LA VÍA DE RESISTENCIA ERK1/2, TRAMETINIB, EN MODELOS *EX VIVO* E *IN VIVO* DE LA ENFERMEDAD

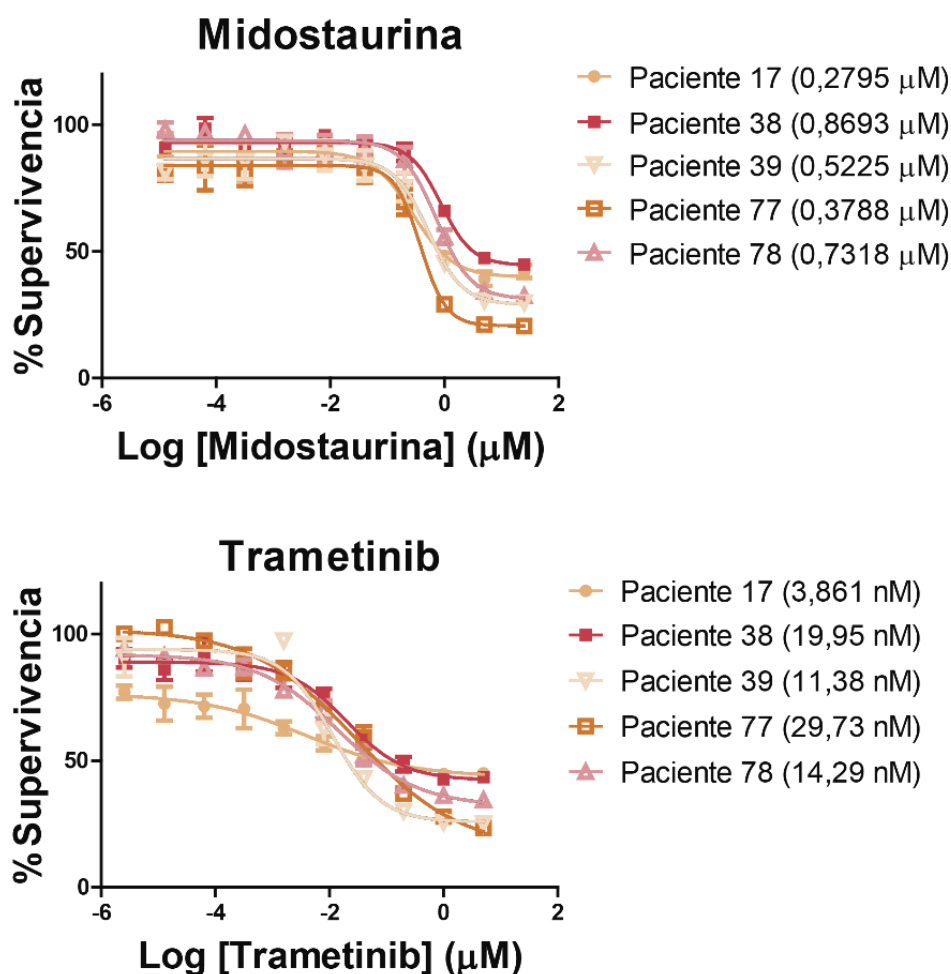
#### 4.2.3.1. Midostaurina y trametinib fueron efectivos en LMA *wildtype* para FLT3 y presentaron sinergia fuerte *ex vivo* en las muestras de pacientes de LMA

La actividad anti-leucémica observada en la combinación de trametinib con midostaurina apuntaba a que la inhibición simultánea de la ruta ERK1/2 y la vía de FLT3 (en estado mutado o *wildtype*) podría ser una estrategia terapéutica efectiva para los pacientes de LMA, como se ha sugerido por parte de otros autores <sup>163</sup>.

Por consiguiente, el próximo paso en este trabajo consistió en examinar si dicha combinación farmacológica mantenía la misma eficacia que se había observado en los experimentos realizados *in vitro* en muestras de 5 pacientes de LMA *ex vivo* (pacientes 17, 38, 39, 77 y 78, detalles resumidos en el anexo 2).

De los 5 pacientes cuyas muestras fueron empleadas, 3 de ellos (pacientes 17, 77 y 78) no presentaban mutaciones en las vías diana de la combinación (FLT3 o RAS). Sin embargo, 2 de ellas presentaban mutaciones en RAS (pacientes 38, en KRAS y 39, en NRAS). De las cuales, además, la paciente 38 presentaba una mutación puntual en FLT3.

No obstante, los experimentos realizados, mostraron valores de citotoxicidad y sinergia fuerte ( $CI \leq 0,5$ ) en cada caso ensayado, sin apreciarse diferencias claras de eficacia farmacológica atendiendo al perfil mutacional de los pacientes. Los valores de IC50 para midostaurina se presentaron en el rango de 0,28 – 0,87  $\mu\text{M}$ , y para trametinib fueron de 3,86 – 29,73 nM (figura 57), mostrándose en consonancia con los valores observados en los experimentos realizados en los modelos *in vitro* de la enfermedad.

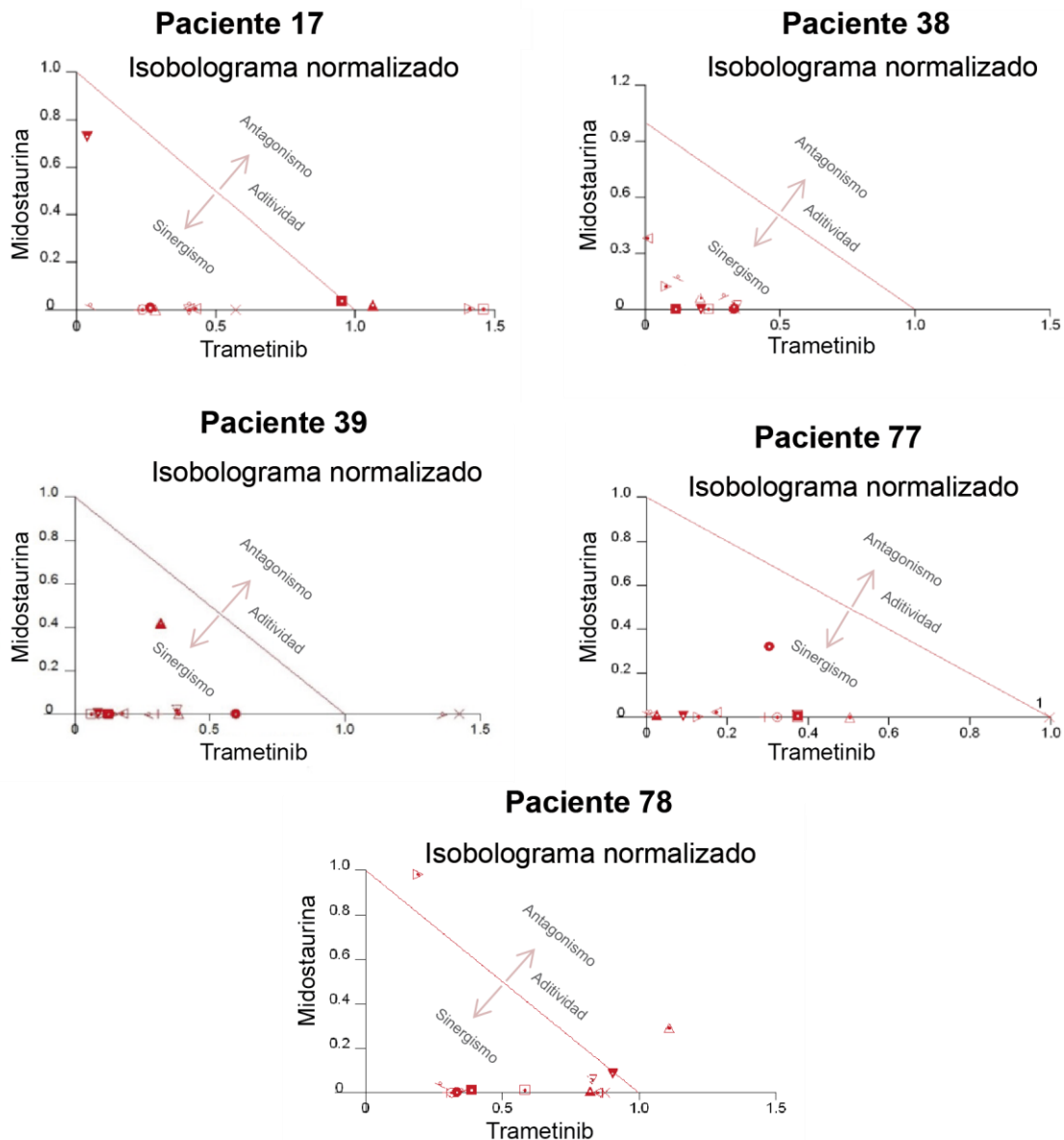


**Figura 57. Midostaurina y trametinib mantuvieron la eficacia farmacológica *ex vivo* en muestras de células primarias de LMA.**

Curvas de dosis-respuesta para midostaurina y trametinib en muestras *ex vivo* de 5 pacientes de LMA.

Además, se observaron valores de índice de combinación acordes a un efecto de sinergia fuerte ( $CI \leq 0,5$ ) en la mayoría de las dosis probadas, como puede apreciarse en los distintos isobogramas normalizados que componen la figura 58.

En general, estos resultados apoyarían el uso de la combinación de midostaurina con trametinib en el contexto de células de pacientes de LMA con *FLT3 wildtype*, *FLT3* mutado, *RAS* mutado o ambos mutados (*FLT3* y *RAS*).



**Figura 58. La combinación de midostaurina con trametinib muestra efectos de sinergia fuerte en muestras de LMA *ex vivo*.**

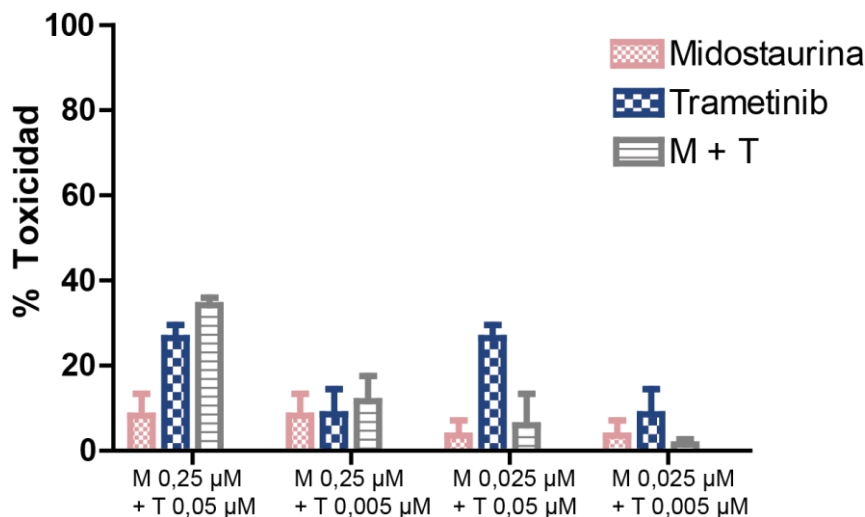
Isobogramas normalizados para trametinib en combinación con el TKI midostaurina en muestras *ex vivo* de 5 pacientes de LMA. Se representan las gráficas de tres experimentos independientes para cada paciente.

#### 4.2.3.2. La combinación de midostaurina y trametinib demostró ser segura *ex vivo* en células CD34+ de donantes sanos

Una vez quedaron demostrados los efectos citotóxicos y de sinergia fuerte en células primarias de pacientes con LMA *ex vivo*, el siguiente paso consistió en investigar si la combinación de los dos fármacos, midostaurina y trametinib, pudiera afectar a la formación de colonias eritroides o granulocíticas-monocíticas en un contexto de células primarias sanas.

Así pues, se probaron diferentes dosis de los fármacos en combinación dentro del rango de los valores de IC50 obtenidos *ex vivo* en pacientes de LMA (consulte las tablas 10 y 11). De este modo, se pudo observar que dosis similares que sí mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento celular de células leucémicas, no mostraron afectación en el crecimiento de colonias de células progenitoras mieloides CD34+ de donantes sanos.

Sólo se observó una leve citotoxicidad en la combinación de midostaurina a 0,25  $\mu\text{M}$  con trametinib a 0,05  $\mu\text{M}$  (observe la figura 59), y en el caso de que hubiera, ligera citotoxicidad, en alguna de las combinaciones restantes ensayadas. Por tanto, se demostró así, que la toxicidad asociada a las combinaciones ensayadas podría ser la misma o menor a la encontrada en el uso por separado de cada fármaco en monoterapia.



**Figura 59. La combinación de midostaurina y trametinib demostró ser segura en células de donantes sanos.**

Los niveles de toxicidad para cada población de colonias (unidades formadoras de colonias eritroides o granulocíticas-monocíticas) a las dosis indicadas tras 13-14 días de crecimiento en medio metilcelulosa. Los datos se representan como el porcentaje de toxicidad relativa al control con DMSO (n = 3).

#### **4.2.3.3. La combinación de midostaurina con trametinib mejoró significativamente la supervivencia global respecto a la monoterapia en un modelo *in vivo* de leucemia mieloide aguda**

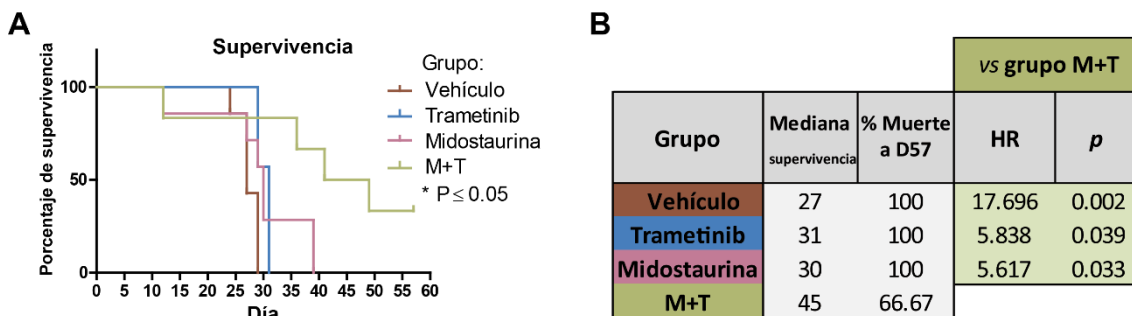
Finalmente, para verificar la eficacia y seguridad de la combinación, se llevó a cabo un estudio *in vivo* con las células OCI-AML3 injertadas en ratones inmunodeficientes NSG. Los ratones fueron injertados con  $5 \cdot 10^6$  de células OCI-AML3, tres días después comenzaron el tratamiento correspondiente (vehículo, trametinib, midostaurina o su combinación) durante 14 días, y posteriormente fueron monitorizados hasta detectar signos evidentes de desarrollo de la enfermedad, los cuales marcaron el momento de sacrificio de los animales.

Con estas premisas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia global entre el grupo de tratamiento con combinación de midostaurina y trametinib, y los grupos de tratamiento con vehículo (DMSO) ( $P = 0,0134$ ), trametinib en monoterapia ( $P = 0,015$ ), y midostaurina en monoterapia ( $P = 0,0295$ ), de manera que, la combinación mostró un incremento en los valores de supervivencia en todas las comparativas (véase la figura 60A).

Los valores de la mediana de supervivencia en días fueron 27 días para el grupo vehículo, 31 días para el grupo tratado con trametinib en monoterapia, 30 días para el grupo tratado con midostaurina en monoterapia y 45 días para el grupo tratado con la combinación de midostaurina y trametinib. Además, el porcentaje de muerte para cada grupo al final del experimento fue de 66,7 % para el grupo de combinación, y el 100 % para el resto de los grupos de tratamiento, pues a día 57, cuando finalizó el experimento, se sacrificaron 2 ratones componentes del grupo de tratamiento con la combinación que no presentaban aún signos aparentes de desarrollo de la enfermedad (véase la figura 60B).

También se comparó el riesgo de muerte asociado a cada grupo de tratamiento respecto al grupo de combinación basado en el análisis de *hazard ratio*: grupo vehículo [HR, 17,696; 95 % intervalo de confianza (IC), 2,965 – 105,613;  $P = 0,002$ ], grupo tratado con trametinib en monoterapia [HR, 5,838; 95 % IC, 1,090 – 31,255;  $P = 0,039$ ], y grupo tratado con midostaurina en monoterapia [HR, 5,617; 95 % IC, 1,150 – 27, 437;  $P = 0,033$ ].

Estos resultados, por tanto, subrayaban la eficacia de la combinación del inhibidor tirosina quinasa, midostaurina, con el inhibidor de MEK1/2, trametinib, *in vivo*.

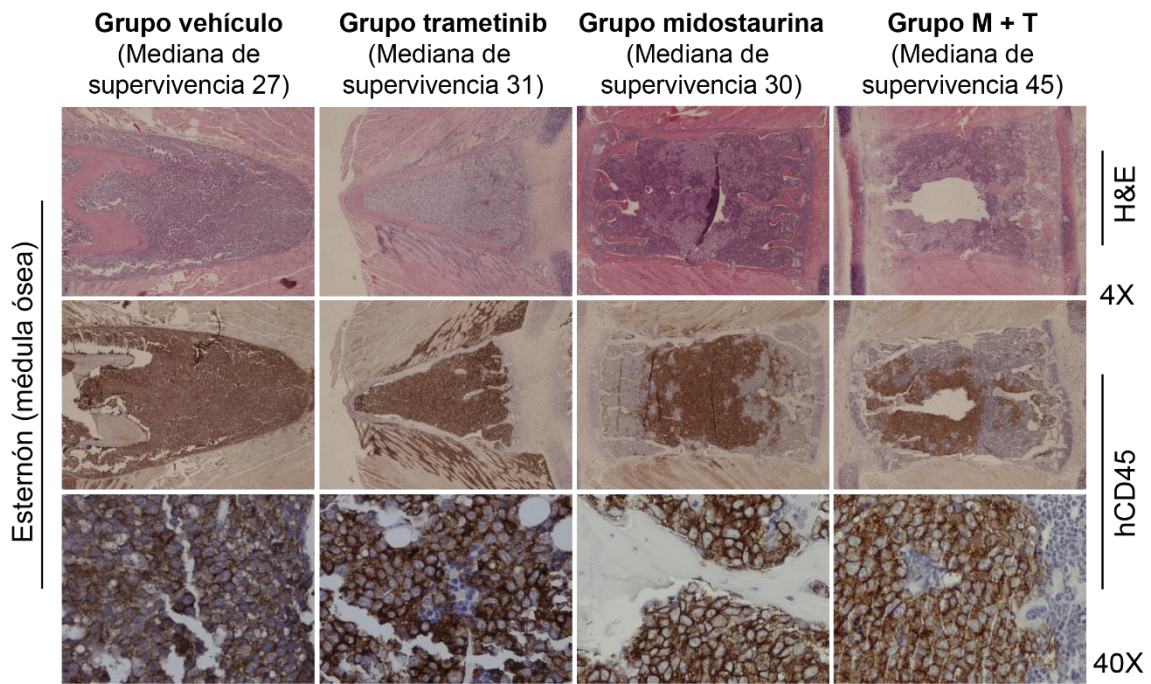


**Figura 60. La combinación de midostaurina y trametinib mejoró la supervivencia significativamente en comparación a los tratamientos en monoterapia *in vivo*.**

(A) Curvas de supervivencia de los grupos de tratamiento con vehículo, trametinib, midostaurina y su combinación en los estudios *in vivo*. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de combinación y los grupos vehículo (\* P = 0,0134), midostaurina (\* P = 0,0295) y trametinib (\* P = 0,0153), aportando, de este modo, la combinación una mejoría en la supervivencia global. (B) Tabla mostrando la mediana de supervivencia en días, % de muerte a día 57 y valores de *hazard ratio* y p valores de cada grupo de tratamiento.

Una vez realizadas las necropsias de los animales de experimentación involucrados en este experimento, se examinaron las muestras histopatológicas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) o teñidas con el anticuerpo anti-CD45 humano, en el caso de la médula ósea. Las tinciones mostraron proliferación de la línea celular humana modelo de LMA, OCI-AML3, *in vivo*, en todos los grupos en el momento de la necropsia (véase la figura 61).

Notablemente, como se ha comentado con anterioridad, al final del experimento, dos de los seis ratones pertenecientes al brazo de tratamiento con la combinación no mostraron signos aparentes de leucemia, y uno de ellos, no presentó infiltración de células leucémicas en médula ósea, demostrando así, que la combinación farmacológica pudo controlar la progresión de la enfermedad por un periodo de tiempo más prolongado que los otros brazos de tratamiento analizados.



**Figura 61. Cortes histológicos de médula ósea de los modelos de LMA *in vivo* teñidos con hematoxilina-eosina y anticuerpo anti-CD45 humano a aumentos 4X y 40X.**

Las imágenes muestran la infiltración de la médula ósea por parte de las células OCI-AML3 injertadas.

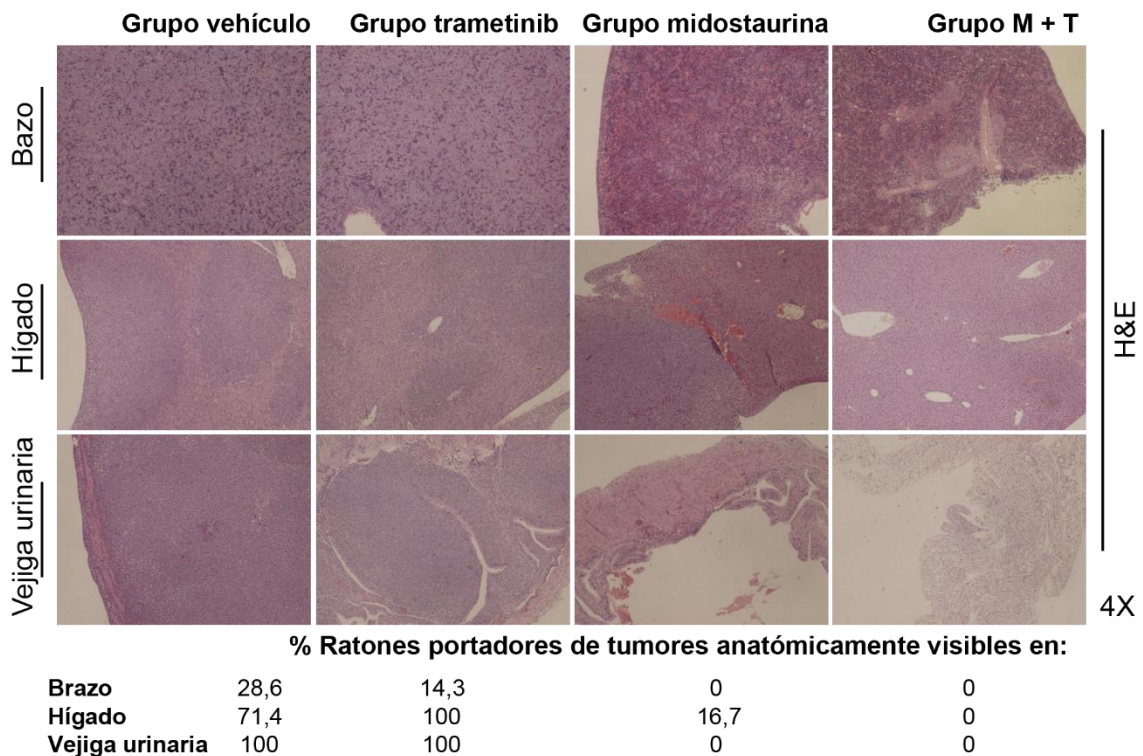
Aunque la presencia de masas celulares extramedulares en pacientes de LMA no es una característica habitual, sino que ocurre inusualmente en algunos pacientes <sup>11</sup>, se visualizaron distintas masas celulares en los animales de experimentación durante la realización de las necropsias. Los tejidos con presencia de tumores se recogieron y se sumergieron en formalina para su posterior inmersión en parafina y subsiguientes análisis.

Se procedió seguidamente a la examinación histológica de las extensiones de bazo, hígado y vejiga urinaria teñidas con hematoxilina-eosina, donde se detectaba la presencia de masas o tumores extramedulares en los grupos de tratamiento con vehículo, trametinib o midostaurina. En dichas imágenes se podía observar la presencia de infiltración extramedular de células OCI-AML3, caracterizada por ser una población celular de mayor tamaño, núcleo poco condensado y presencia de nucleolos. Por el contrario, no se localizó ninguna masa celular o evidencias de infiltración extramedular en el grupo de tratamiento que recibió la combinación, como puede apreciarse en la figura 62.

En la misma figura, se recogió, además, el porcentaje de animales portadores de tumores anatómicamente visibles. En resumen, se pudieron apreciar masas tumorales extramedulares por infiltración de la línea celular OCI-AML3 en el bazo de 2 de 7 (28,6 %) de los componentes del grupo vehículo, y en 1 de 7 (14,3 %) de los integrantes del grupo tratado con trametinib, mientras que no se observaron tumores en los otros dos grupos de tratamiento estudiados, midostaurina y combinación.

Por otro lado, se observaron masas celulares en el hígado de 5 de 7 (71,4 %) y de 1 de 6 (16,7 %) de los integrantes de los grupos vehículo y midostaurina respectivamente, y en el total (100 %) de los componentes del grupo tratado con trametinib. En este caso, tampoco se observaron masas en el grupo tratado con la combinación.

Por último, en la vejiga urinaria, se encontraron tumores extramedulares en el total de animales de los grupos vehículo (100 %) y trametinib (100 %). Y al igual que ocurría en bazo, en dicho tejido, tampoco se localizaron masas celulares en los animales tratados con midostaurina o su combinación con trametinib.



**Figura 62. Cortes histológicos de bazo, hígado y vejiga urinaria teñidos con hematoxilina-eosina mostrando secciones tumorales o no tumorales en cada caso.**

El porcentaje de ratones portadores de tumores anatómicamente visibles en cada grupo de tratamiento se representa debajo de las imágenes.

Teniendo en cuenta estos resultados, los datos presentados demostraban que la combinación de midostaurina con trametinib podía mejorar significativamente la supervivencia y controlar la progresión de la enfermedad por un periodo de tiempo más prolongado que los tratamientos administrados en monoterapia. Estos resultados también apoyarían la aplicabilidad de la combinación en el contexto no sólo de LMA con mutaciones en *FLT3*, *RAS* o ambos, sino también en LMA con fondo genético *wildtype* para ambos genes.



# 5. DISCUSIÓN



## 5.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA A CITARABINA

Los esquemas de quimioterapia 7 + 3 para el tratamiento de la LMA han permanecido de manera invariable como el tratamiento de elección durante varias décadas <sup>90</sup>. Y aunque la citarabina ha mostrado ser un agente terapéutico efectivo para el tratamiento de la enfermedad <sup>93</sup>, más del 80 % de los pacientes generan resistencia farmacológica al mismo <sup>94</sup>. Estas resistencias son las principales responsables de la mortalidad asociada a la enfermedad <sup>119</sup>, representando una clara necesidad clínica que debe ser abordada.

A lo largo de los años, se han ido describiendo distintos mecanismos de resistencia farmacológica a citarabina, como la presencia de mutaciones en ciertos genes <sup>44,143-145</sup>, alteraciones en la expresión de algunos ARNs <sup>146,147</sup> o proteínas <sup>47,148</sup>, alteraciones en las vías de metabolismo de la citarabina <sup>92,133,149,150</sup> o la activación de distintos mecanismos propios de las células madre hematopoyéticas que favorecen la quimiorresistencia <sup>152-154,156,157</sup>.

### 5.1.1. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS PROTEÍNAS SR EN EL DESARROLLO DE LA LMA Y LA RESISTENCIA A CITARABINA.

Las alteraciones en los mecanismos de corte y empalme del ARN mensajero en LMA se han puesto de manifiesto previamente por diversos grupos. Tal es así, que en la patología se han descrito mutaciones genéticas en ciertos componentes de la maquinaria del espliceosoma, como las proteínas SR <sup>22,23,47</sup>, diferencias de expresión de algunas moléculas <sup>55-58,58,186</sup> o evidencias del fallo funcional de estas mismas <sup>60</sup>, impulsando la exploración de nuevos tratamientos para la enfermedad.

Los estudios a gran escala, como los del TCGA, que analizan genomas de 200 muestras de pacientes adultos de LMA *de novo* <sup>22</sup> han permitido distinguir las principales alteraciones genéticas presentes en la enfermedad. Empleando dichos datos, gracias a la plataforma GEPIA2, en este trabajo se comprobó que, concretamente, existen diferencias en la expresión de los genes codificantes de las proteínas SR *SRRM2*, *SRSF12* y *SRSF9* entre las condiciones de LMA y control (muestras de médula ósea). Además, la sobre-expresión de *SRRM2* se validó en una serie propia de pacientes, donde se observó un incremento significativo de su expresión no sólo en LMA sino también en NMP respecto a controles. Esta situación apuntaba a un posible papel para la sobre-expresión del gen en el desarrollo de enfermedades mieloides, al igual que se ha descrito con *SRSF3* en cáncer de mama, pulmón, piel, colon<sup>56</sup>, o con *SRSF6* en cáncer de colon, pulmón<sup>57</sup> y piel<sup>58</sup>.

Se ha referido que en células T CD4+ humanas sanas, la reducción de la expresión de *SRRM2* por *knockdown* no impacta en la proliferación celular, pero sí altera la expresión de múltiples citoquinas<sup>188</sup>. Por el contrario, el silenciamiento del gen en carcinoma nasofaríngeo, donde se ha descrito su sobre-expresión, disminuye la proliferación, y bloquea el ciclo celular potenciando la apoptosis en modelos celulares de la enfermedad<sup>186</sup>. Posiblemente, aunque no haya sido objeto de este trabajo, el silenciamiento del gen *SRRM2* en un contexto tumoral, como en leucemia mieloide aguda, donde se encuentra sobre-expresado al diagnóstico, puede presentar efectos similares en la patología a los observados en carcinoma nasofaríngeo.

Además, algunas alteraciones en el proceso de corte y empalme del ARN mensajero no sólo se han vinculado con la LMA, sino que también se han definido como la posible causa o consecuencia del desarrollo de la resistencia farmacológica en la enfermedad<sup>47</sup>. Y, en concreto, la presencia de ciertas mutaciones en la maquinaria del espliceosoma se ha relacionado con resistencia a quimioterapia en la LMA secundaria<sup>23,35,44</sup>.

En particular, al emplear los datos de expresión del TCGA – LAML de los genes codificantes de proteínas SR en los pacientes de LMA al diagnóstico, y separarlos por respuesta al tratamiento con citarabina (respondedores o no respondedores), no se evidenciaron diferencias entre ambos grupos. Por lo que, aunque cabría esperar que se hubieran detectado alteraciones al diagnóstico de pacientes con LMA respondedores y no respondedores a citarabina (como causa de la resistencia), probablemente, al diagnóstico, no se podría predecir la respuesta que presentarán al tratamiento los pacientes con LMA si se atendiera a las alteraciones genéticas de las proteínas SR. Es decir, que estos resultados indicaban la posible presencia de otras alteraciones en las proteínas SR implicadas en la respuesta a citarabina que no se hubieran detectado a nivel de expresión génica con los datos del TCGA.

Cabe mencionar que, más aún, en una enfermedad tan heterogénea como la LMA, el método de estudio más fiable de estas características es realizar comparativas de muestras pareadas de un mismo paciente, para así evitar resultados falsos que realmente se deban a la variabilidad interpersonal<sup>195</sup>. En línea con esta premisa, al comparar de manera pareada (diagnóstico vs resistencia) las muestras de médula ósea de siete pacientes con LMA, tampoco se detectaron diferencias en los niveles de expresión de *SRRM2*.

Por lo que se concluyó que la expresión génica de proteínas SR, en concreto de *SRRM2*, parecía estar vinculada con el desarrollo de la enfermedad, pero no con la respuesta farmacológica a citarabina que se presente.

### 5.1.2. CARACTERIZACIÓN PROTEICA DE LAS PROTEÍNAS SR EN LMA Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON CITARABINA.

En LMA, al igual que en otros cánceres, los estudios “-ómicos” con muestras *ex vivo* han permitido la integración de datos genómicos, transcriptómicos, proteómicos, y de sensibilidad farmacológica <sup>141,193,194,196</sup>. De manera que proporcionan herramientas precisas para encontrar perfiles moleculares que se asocian concretamente a sensibilidad farmacológica o resistencia para así poder seleccionar los tratamientos que resulten más efectivos en cada caso.

En este sentido, los estudios proteómicos facilitan la detección de las proteínas expresadas diferencialmente tras un tratamiento determinado. Y, en consecuencia, ayudan a correlacionar las huellas moleculares que se desencadenan directamente dentro de la enfermedad con la selección de los mejores tratamientos disponibles para la LMA <sup>197</sup>. Todo ello resulta especialmente interesante en la patología si ese perfil proteómico se vincula con resistencias farmacológicas.

Por el momento, se han publicado pocos estudios que analicen el perfil proteómico completo de la LMA con muestras *ex vivo* <sup>198–202</sup>. Concretamente, el grupo de Aasebø E. y colaboradores <sup>201</sup>, analizaron el perfil proteómico de pacientes con LMA al diagnóstico, y compararon el proteoma de pacientes que recayeron tras la quimioterapia y pacientes que permanecieron libres de la enfermedad durante un periodo de 5 años. Estos autores, evidencian algunas diferencias entre ambos grupos, vinculando a los pacientes que recaen con la presencia de alteraciones en proteínas involucradas en rutas de señalización de procesamiento del ARN.

El estudio mencionado <sup>201</sup> soportaría los resultados observados en esta tesis, donde al analizar los patrones de fosforilación de muestras pareadas de pacientes con LMA al momento del diagnóstico y de la resistencia a citarabina se detectaron alteraciones en la fosforilación de algunas proteínas SR, como SRRM2, proteínas vinculadas a los mecanismos de corte y empalme del ARN mensajero.

De manera que, se podría teorizar que la existencia de alteraciones en proteínas vinculadas al procesamiento del ARN puede ser una señal que lidera las recaídas, y, por tanto, podría tratarse de una alteración presente al diagnóstico de los pacientes que posteriormente recaen, pero no estaría presente en pacientes que responden al tratamiento como describen Aasebø E. y colaboradores <sup>201</sup>.

Es decir, el tratamiento con esquemas de quimioterapia enriquecería el crecimiento de poblaciones celulares que presentan ciertas alteraciones al diagnóstico, las cuales sobreviven durante el tratamiento y acaban siendo mayoritarias en el momento de la resistencia farmacológica, como se detectó mediante el perfilado fosfo-proteómico con muestras pareadas de pacientes con LMA en este trabajo.

Como se ha explicado con anterioridad, las modificaciones postraduccionales, principalmente la fosforilación, permiten la regulación del *splicing* a través de la localización subcelular de las proteínas SR<sup>45,203</sup>, y la hiper- e hipo- fosforilación de éstas mismas altera su funcionalidad<sup>60</sup>.

Adicionalmente en este trabajo, a pesar de que los estudios de fosfo-proteómica se realizaron en un tamaño muestral reducido, las alteraciones en la fosforilación de las proteínas SR que se identificaron por fosfo-proteómica se validaron por inmunohistoquímica en muestras *ex vivo* de pacientes con LMA, relacionando la presencia de mayores niveles de expresión de proteínas SR fosforiladas con resistencia farmacológica a citarabina.

Al realizar la comparativa de muestras pareadas de diagnóstico vs resistencia adquirida (recaída) de cuatro pacientes, se observó un incremento en la fosforilación de las proteínas SR en el momento de la recaída de pacientes que habían sido tratados con citarabina. Pero dicho aumento no se relacionó con alteraciones de su localización.

Es decir, se concluyó que la alteración de este mecanismo no se relacionaba con retención de las proteínas SR, sino más bien con cambios en su actividad o funcionalidad, ya fueran alteraciones que afectaran al ensamblaje del complejo del espliceosoma en núcleo<sup>38</sup>, o alteraciones que afectaran al transporte del ARN mensajero entre el núcleo y el citoplasma<sup>39,42</sup>.

No obstante, en otro enfoque del estudio, empleando muestras también pareadas de tres pacientes que mostraron, en este caso, resistencia primaria (refractariedad) al tratamiento con citarabina no se apreciaron diferencias entre los momentos de diagnóstico y refractariedad.

Sin embargo, ambas observaciones cobraban sentido al comparar los niveles de proteínas SR fosforiladas al diagnóstico de pacientes que alcanzaron remisión completa (respondedores) o no (no respondedores) tras el tratamiento con el compuesto. En esta comparativa se apreciaba que aquellos pacientes que mostraban resistencia primaria al tratamiento presentaron mayores niveles de proteínas SR fosforiladas al diagnóstico en comparación con los pacientes que alcanzaron remisión completa.

Dadas estas evidencias, se pudo teorizar que dichas alteraciones, ya presentes en el momento del diagnóstico, supondrían la predisposición a presentar resistencia farmacológica en el momento pre- tratamiento, y, por tanto, serían responsables de que la citarabina no funcionara en dichos pacientes desde el comienzo. Esta teoría sería similar a lo que postulan que ocurre, por ejemplo, con la presencia de mutaciones en *TP53*<sup>143</sup>, o *FLT3-ITD*<sup>144</sup> al diagnóstico de los pacientes con LMA, mutaciones que promueven la quimiorresistencia primaria al compuesto.

En base a estos hallazgos, se ha propuesto la cuantificación de la expresión de las proteínas SR fosforiladas como un biomarcador predictor de la respuesta a citarabina para los pacientes con LMA, no vinculado a mutaciones concretas en los componentes de la maquinaria del *splicing*.

La continuación de los estudios en esta línea, como podría ser su validación en una serie de pacientes de otros centros hospitalarios, permitiría demostrar la empleabilidad de este biomarcador en la práctica clínica. De validarse en una cohorte independiente, serviría para realizar una mejor estratificación de los enfermos de leucemia mieloide aguda, evitando la administración de un fármaco como citarabina, el cual presenta una elevada toxicidad hematológica, neurológica, hepática y gastrointestinal<sup>204</sup>.

### **5.1.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL MECANISMO DE CORTE Y EMPALME DEL ARN MENSAJERO EN RELACIÓN CON LA RESPUESTA A CITARABINA.**

Los resultados descritos previamente pusieron de manifiesto la existencia de cambios en la fosforilación de las proteínas SR en la condición de resistencia a citarabina, y, por tanto, la posible disfunción del proceso de corte y empalme del ARN mensajero.

En consecuencia, las alteraciones del *splicing* en cáncer podrían modificar la funcionalidad de oncogenes, proteínas supresoras de tumores, factores de *splicing*, proteínas de apoptosis, de proliferación celular<sup>25,27,47</sup>, etc...

Y, en particular en la LMA, las variaciones en los mecanismos del *splicing* se han descrito como una señal de identidad de la enfermedad<sup>60</sup>. En los pacientes de LMA, el malfuncionamiento del proceso se ha vinculado concretamente con alteraciones en el *splicing* de ciertas rutas de señalización como FLT3, CD13, cKIT, NOTCH, PI3K, MAPK, vías que están involucradas en la regulación del ciclo celular, apoptosis, transformación celular y *splicing*<sup>60</sup>.

En este trabajo se puso en evidencia que algunas dianas de proteínas SR, como las dianas pro-apoptóticas de *SRRM2*, *BAX* y *CASP3*, las dianas *MYLK* o *Ki-67*<sup>186</sup>, las dianas de *U2AF1*, *H2AFY*<sup>54</sup> y *WAC*<sup>139</sup>, o la diana de *SRSF1*, *S6K1*<sup>139</sup> mostraban un patrón de uso diferencial de exones entre el momento del diagnóstico y la resistencia farmacológica, empleando muestras pareadas de 25 pacientes con LMA.

En resumen, las modificaciones presentes en la fosforilación de las proteínas SR podrían derivar en el malfuncionamiento del *splicing*, favoreciendo posiblemente la generación de variantes más patogénicas.

En el diagnóstico de pacientes que posteriormente recaen, estas alteraciones ya estarían presentes en un porcentaje bajo, y se enriquecerían tras recibir el tratamiento y escapar al efecto de la citarabina. Mientras que en el diagnóstico de pacientes refractarios estas alteraciones se darían en mayor porcentaje y por ello, los pacientes no responderían al tratamiento con citarabina desde el comienzo.

#### **5.1.4. EVALUACIÓN DE INHIBIDORES DEL MECANISMO DE CORTE Y EMPALME DEL ARN MENSAJERO EN MONOTERAPIA O EN COMBINACIÓN EN MODELOS *IN VITRO* DE LMA.**

Las evidencias presentadas en este trabajo demostraban que el proceso de corte y empalme del ARN mensajero sufría un malfuncionamiento en la LMA que se relacionaba con la sensibilidad farmacológica a citarabina. Por ello, la inhibición del *splicing* despertaba más que cierto interés como diana terapéutica en la enfermedad.

El proceso de corte y empalme del ARN mensajero es esencial para la funcionalidad normal de las células, de ahí que el principal dilema del uso de inhibidores frente a este proceso siempre sea cómo inhibirlo de manera que sólo afecte a genes seleccionados sin alterar otros procesos esenciales<sup>24</sup>. En cambio, se conoce que hay un balance delicado establecido en células cancerígenas entre las alteraciones que afectan al *splicing* y favorecen el crecimiento del tumor, y la preservación de una expresión génica basal que se requiere normalmente para el funcionamiento celular<sup>48</sup>.

De tal modo que, la inhibición farmacológica del espliceosoma afecta principalmente a las células cancerígenas (que muestran deficiencias de *splicing* y no tienen ARNm canónicos suficientes para sobrevivir), mientras que las células sanas son capaces de tolerar cierto grado de inhibición porque aún tendrían productos de *splicing* canónicos suficientes<sup>54</sup>.

Las líneas celulares de LMA que se emplearon en este trabajo OCI-AML3, SKM-1 y THP-1 presentaron sensibilidad farmacológica a los distintos inhibidores de *splicing* testados, e incluso mantuvieron esa sensibilidad en el modelo de resistencia farmacológica a citarabina generado, OCI-AML3\_R20 $\mu$ MC.

En especial, el fármaco H3B-8800 presentó mejor eficacia *in vitro* en los contextos de sensibilidad y resistencia a citarabina que el resto de los inhibidores testados (madrasin, SPHINX31 y SRPKIN-1). Y, aunque se ha descrito que su actividad va especialmente ligada a la presencia de mutaciones en *SF3B1*<sup>48,54,59</sup>, ni la línea OCI-AML3 parental, ni la resistente generada mostraron mutaciones en el gen. Posiblemente, como se ha sugerido en la literatura<sup>101</sup> ese buen perfil de eficacia pueda deberse a la actividad del compuesto en la inhibición de la catálisis del *splicing* independientemente del estado mutacional del gen.

Por el momento, los estudios preclínicos con H3B-8800 han puesto en evidencia el potencial del uso de este inhibidor en el tratamiento de las enfermedades mieloides que porten mutaciones en factores de *splicing*<sup>54</sup>. Y en este trabajo, los resultados presentados evidenciaron que H3B-8800 podía resultar igualmente útil para el tratamiento de modelos celulares de LMA que no presenten mutaciones en genes de *splicing*.

Al igual que otros inhibidores de las quinasas SRPK1 y SRPK2 han mostrado eficiencias *in vivo* en modelos animales, como SPHINX que reduce el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de próstata en ratones<sup>205</sup> o SRPIN340 que inhibe la tumorigénesis en xenoinjertos de melanoma<sup>206</sup>, se esperaba que los inhibidores homólogos empleados en este trabajo hubieran presentado eficacias similares.

Por contra, los inhibidores SPHINX31 y SRPKIN-1 no mostraron los resultados esperados, lo cual, podría deberse a dos motivos: 1) la eficacia de dichos inhibidores *in vitro* aún no es suficiente pues no han pasado a la fase de ensayo clínico para ninguna patología, mientras que H3B-8800 está siendo estudiado en un ensayo clínico en fase I para LMA concretamente; o 2) las alteraciones de la fosforilación en las proteínas SR encontradas no sean dianas directas de SRPK1, SRPK2 o Clk1, sino más bien, dianas de otros eventos también descritos<sup>25,46</sup>, como la fosforilación mediante MAPK, GSK3 $\beta$  etc...

En definitiva, los experimentos que se mostraron en esta parte del trabajo plasmaron que la inhibición del *splicing* era una estrategia prometedora en LMA, incluso cuando existía resistencia farmacológica al compuesto citarabina.

Sin embargo, como ocurre con la mayoría de los fármacos empleados para la enfermedad, los resultados publicados hasta el momento del ensayo clínico de H3B-8800 para LMA han mostrado que, aunque el tratamiento es seguro para los pacientes con LMA <sup>54</sup>, no es suficiente para alcanzar respuestas completas <sup>59</sup>.

Por ello, se testaron *in vitro* diferentes combinaciones de este fármaco con otros inhibidores que estaban aprobados para su uso en el tratamiento de la LMA, ya que posiblemente la combinación de ellos permitiría mejorar las respuestas alcanzadas, así como la longevidad de éstas en el tiempo.

Las distintas combinaciones testadas de H3B-8800 junto con citarabina, azacitidina, decitabina, glasdegib, midostaurina o venetoclax demostraron que todas ellas eran sinérgicas. Sin embargo, la combinación del inhibidor de *splicing*, H3B-8800, con el inhibidor de Bcl-2, venetoclax, presentó la sinergia farmacológica más potente *in vitro* tanto en las células sensibles como en las células resistentes a citarabina.

El empleo de venetoclax en LMA, aunque no se dirige a una diana descrita en la enfermedad (Bcl-2), sí inhibe mecanismos protectores característicos de las células madre, que favorecen la evasión de la acción farmacológica de diversas drogas <sup>84</sup>.

Además, se ha descrito que el silenciamiento de *SRRM2* aumenta los niveles de proteínas pro-apoptóticas como Bax o Caspasa 3, mientras que disminuye los niveles de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 o Ki-67 <sup>186</sup>. Se podría entender, por tanto, que la alta expresión de *SRRM2* en LMA favorecería el aumento de expresión de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica), liderando la malignización de la enfermedad. E incluso, no sólo *SRRM2* señala a través de la inhibición de la apoptosis, sino que también *SRSF1* interviene en la expresión de isoformas pro-apoptóticas atendiendo a su activación <sup>139</sup>.

Por lo que el uso combinado de ambos fármacos (H3B-8800 y venetoclax) podría dirigirse de manera sinérgica a inhibir los procesos que permiten la evasión de la apoptosis en dichas células blásticas.

Asimismo, los buenos resultados que ha mostrado venetoclax en LMAs de nuevo diagnóstico en combinación con hipometilantes o citarabina a bajas dosis <sup>207</sup>, lo convierten en un fármaco en auge cuya posibilidad de emplearlo en otros contextos de la enfermedad, como en pacientes R/R (refractarios o en recaída) despierta gran interés clínico <sup>125</sup>.

### 5.1.5. ESTUDIO DE LA EFECTIVIDAD Y SEGURIDAD DE LA INHIBICIÓN DEL *SPLICING* EN COMBINACIÓN CON LA INHIBICIÓN DE BCL-2 EN MUESTRAS *EX VIVO* DE LMA.

La gran heterogeneidad que caracteriza a la LMA evidencia que no únicamente han de realizarse experimentos en un contexto *in vitro* donde la homogeneidad de las células puede enmascarar las características reales de la enfermedad <sup>141</sup>.

En este sentido, los modelos preclínicos como los cultivos *ex vivo* cubren esa necesidad. Los modelos *ex vivo* sirven principalmente para estudiar nuevos tratamientos y combinaciones farmacológicas, así, como para descubrir biomarcadores de respuesta a fármacos o resistencia.

Y, aunque los ensayos clínicos aleatorizados permanecen como el método de elección para la evaluación de la eficacia en los pacientes con LMA, no son siempre posibles, suponen muchos gastos, resultados a largo tiempo y pocas posibilidades de explorar varios fármacos <sup>141</sup>.

Por ello, se evaluó la eficacia resultante de combinar el inhibidor de *splicing*, H3B-8800, con el inhibidor de Bcl-2, venetoclax, en células primarias de tres pacientes con LMA al diagnóstico. Estos experimentos demostraron que la combinación mantuvo los valores de sinergia potente en el contexto *ex vivo* en pacientes enfermos de LMA, lo cual permitiría la reducción de las dosis de cada fármaco para conseguir los mismos efectos.

Esta característica es siempre interesante en cualquier combinación pues posibilita alcanzar los mismos resultados de efectividad, a la vez que evita la aparición de efectos secundarios indeseados <sup>208</sup>.

Este hecho presenta una gran relevancia si se tiene en cuenta que una de las principales limitaciones del empleo de agentes antitumorales es el desarrollo de mielotoxicidad <sup>209</sup>. La mielotoxicidad se define como el efecto agudo de tóxicos en progenitores de médula ósea, que podría afectar directamente a la generación de colonias de progenitores de granulocitos-macrófagos o de poblaciones eritroides <sup>209</sup>, en un tejido que ya sufre alteraciones en la generación de poblaciones sanguíneas.

Los niveles de hematotoxicidad de los distintos fármacos antitumorales se cuantificaron atendiendo al número de progenitores supervivientes tras una exposición al fármaco en cuestión <sup>209</sup>.

Los estudios sobre este aspecto no mostraron afectación de los progenitores hematopoyéticos en ninguna de las combinaciones ensayadas, demostrando que dosis similares de los fármacos lograban disminuir la supervivencia de los blastos de pacientes enfermos de LMA, sin afectar a la formación de colonias mieloides sanas, probando así ser una combinación segura en un contexto *ex vivo* de la enfermedad.

Los resultados discutidos en ese apartado sugieren que las alteraciones en el proceso de corte y empalme del ARN mensajero estarían vinculadas con el desarrollo de la leucemia mieloide aguda, y que su actividad aberrante podría estar relacionada con la resistencia primaria o secundaria al tratamiento con citarabina.

Por ello, la inhibición del mecanismo de corte y empalme del ARN mensajero, en monoterapia o en combinación con venetoclax, podría ser una buena estrategia para el tratamiento de aquellos pacientes con LMA al diagnóstico o que se encuentren en recaída / refractariedad.

Por tanto, los resultados de este trabajo sientan las bases para plantear un hipotético ensayo clínico que evalúe la eficacia de la combinación de venetoclax con H3B-8800 en LMA al diagnóstico o en R/R.

## **5.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS INHIBIDORES TIROSINA QUINASA**

La aprobación de imatinib para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica desencadenó la evaluación de numerosos inhibidores tirosina quinasa para otros cánceres. En LMA, se esperaba que los tratamientos en monoterapia con los TKIs que presentan actividad frente a FLT3 aportaran un beneficio similar al observado con imatinib en leucemia mieloide crónica, aunque, los resultados no fueron los esperados dada la complejidad de la enfermedad <sup>86</sup>.

Las diferentes mutaciones presentes en el gen *FLT3*, así como la sobre-expresión de éste lideran la activación constitutiva del receptor tirosina quinasa y sus vías de señalización subyacentes <sup>63,66,73,170,210–212</sup>.

Varios inhibidores de FLT3 que permiten la inhibición sostenida de la proteína *in vitro* han mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos en pacientes con LMA<sup>210,213</sup>.

De hecho, dos de ellos, midostaurina y gilteritinib, ya están aprobados para su uso en la práctica clínica. Sin embargo, las respuestas que se obtienen son cortas y no se prolongan en el tiempo <sup>70</sup>, principalmente debido a la aparición de resistencias secundarias a los inhibidores de FLT3 (FLT3i).

Se han descrito numerosos mecanismos de resistencia a ellos, como la adquisición de mutaciones en el gen *FLT3*, u otros genes no diana <sup>9,69,87,111,166,167</sup>, alteraciones en ciertas vías de señalización paralelas al receptor o de supervivencia celular <sup>70,110,119,124,131,132,163,168–170,173,174,177</sup>, alteraciones en el metabolismo de fármacos <sup>178</sup> o mecanismos protectores derivados del microambiente tumoral <sup>179</sup>.

### **5.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA FARMACOLÓGICA A LOS INHIBIDORES DE FLT3.**

Los pacientes con LMA que presentan mutaciones en *FLT3* al diagnóstico son un ejemplo de cómo, aunque los tratamientos con inhibidores de FLT3 parecían prometedores, no son completamente eficientes por su alta vulnerabilidad al desarrollo de distintos mecanismos de resistencia <sup>138</sup>. La carencia de eficacia de estos inhibidores supone la necesidad de prevenir los mecanismos de resistencia farmacológica que puedan desencadenarse en los pacientes con LMA.

Como se ha comentado anteriormente, los estudios “-ómicos” de muestras pareadas permiten estudiar los cambios producidos durante la resistencia de manera individualizada eludiendo la variabilidad interpersonal. La secuenciación de muestras en recaída tras el tratamiento, para el caso de la LMA, no ha mostrado mutaciones en común en series de varios pacientes con la enfermedad <sup>214,215</sup>. Sin embargo, las series con objetivos concretos (como resistencias a inhibidores tirosina quinasa) han revelado la adquisición de mutaciones comunes en ciertos genes como *FLT3* o *NRAS* <sup>9,87,166</sup>.

Por otro lado, los estudios fosfo-proteómicos permiten recoger información relevante sobre la activación de vías de señalización concretas para poder realizar la selección del tratamiento más efectivo.

Algunos autores como van Alphen C. y colaboradores <sup>194</sup> han descrito qué quinastas se hiper- activan en la LMA *in vitro* para seleccionar estrategias terapéuticas con fármacos en combinación. Mientras que, otros grupos <sup>199</sup>, han caracterizado el perfil fosfo-proteómico de 6 pacientes respondedores y 6 pacientes no respondedores al FLT3i quizartinib. Pero ningún trabajo publicado hasta la fecha evalúa las muestras de manera pareada antes y después de desarrollar la resistencia farmacológica.

En cambio, en este trabajo se realizó el primer estudio hasta el momento que caracterizaba el perfil fosfo-proteómico de muestras *ex vivo* pareadas de un paciente de LMA con mutaciones en *FLT3*, asociado a la resistencia clínica al inhibidor de FLT3 sorafenib. Dicho perfil, además, no está relacionado con la adquisición de nuevas mutaciones en el gen *FLT3*, ni en otras dianas subyacentes a la activación del receptor como *NRAS*, *JAK* o *PI3K*, sino al aumento de la fosforilación en proteínas dianas de ERK1/2, relacionándolo, por tanto, con mayor actividad de la proteína durante el desarrollo de la resistencia farmacológica.

Asimismo, se validó por inmunotransferencia la hiperactivación de ERK1/2 observada mediante fosfo-proteómica, empleando muestras del mismo paciente, y, además, mediante inmunohistoquímica con muestras pareadas de otros dos pacientes con LMA. Estos dos pacientes también presentaban mutaciones en el gen *FLT3* y habían desarrollado resistencia adquirida al tratamiento con los inhibidores de FLT3, ya fueran sorafenib o midostaurina.

De este modo, se demostraba que la activación de la ruta ERK1/2 estaba implicada en la resistencia a los inhibidores de FLT3.

Algunos grupos, mediante otros estudios, han puesto de manifiesto también la activación de la vía MAPK como un mecanismo común de resistencia a los TKI <sup>124,131,160,163,216</sup>, y concretamente a sorafenib en cáncer hepático <sup>129</sup>, o a midostaurina en LMA <sup>124,171</sup>.

El aumento de actividad de ERK1/2 puede presentar numerosas consecuencias en la célula, pues dispone de diferentes dianas en núcleo (p.ej. c-Fos o c-Myc) y en el citoplasma (p.ej. quinasas ribosomales S6), aunque el mecanismo que regula su localización subcelular no está claro <sup>217</sup>. Una de las dianas más conocidas es c-Myc, a la cual fosfo-ERK1/2 fosforila y estabiliza promoviendo el crecimiento celular, papel que se revierte por la quinasa GSK3 $\beta$ , la cual fosforila a c-Myc promoviendo su ubiquitinación y degradación <sup>76</sup>. Además, también se ha descrito que la sobre-activación de ERK puede inducir la modulación de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2, una proteína que está ligada a resistencias farmacológicas en algunos tipos de cáncer de mama <sup>122</sup>.

En particular, en estos estudios de inmunohistoquímica no se detectó una localización preferente de fosfo-ERK1/2 en la resistencia a TKI, por lo que no se pudo vincular la activación de ERK1/2 con mayor activación de sus dianas nucleares o citoplásmicas, sino más bien, como la activación en conjunto y global de sus vías subyacentes.

A fin de poder estudiar los mecanismos funcionales derivados de la resistencia a los FLT3i, así como el empleo de distintos inhibidores, se generó un modelo *in vitro* de resistencia farmacológica. Para ello se empleó el FLT3i sorafenib, el cual, aunque ha mostrado ser muy efectivo *in vitro* en monoterapia, es vulnerable a la generación de resistencias, como así demostró la línea celular resistente generada con mutaciones *FLT3*-ITD en heterocigosis, MOLM13\_R20nMS, también resistente a midostaurina. Esta nueva línea, de nuevo, presentó la activación de ERK1/2 en relación con la resistencia a los inhibidores de FLT3.

Los estudios de secuenciación masiva realizados con la línea celular resistente descartaron la adquisición de mutaciones en el gen *FLT3* y otras vías subyacentes, al igual que han descrito otros autores en modelos de resistencia similares <sup>70</sup>.

Cabe mencionar que la generación de modelos *in vitro* de resistencias a sorafenib también se ha llevado a cabo por otros grupos <sup>121,160,161</sup>, algunos de los cuales describen al igual que en este trabajo, activación de la vía ERK1/2 como un mecanismo de resistencia farmacológica, en concreto, en carcinoma hepatocelular <sup>129</sup>.

Además, la implicación de la vía MAPK observada *ex vivo* durante las resistencias a FLT3i se validó *in vitro* a través de otro método de selección de resistencias por citometría de flujo, poniendo en evidencia una vez más la hiperactivación de ERK1/2 tras el tratamiento con los FLT3i.

Todas estas premisas sugerían que la activación de ERK1/2 tras el tratamiento con FLT3i serviría como biomarcador del fallo de la respuesta a los inhibidores. Ello, apuntaba a que la inhibición simultánea del receptor FLT3 y la vía pro-supervivencia ERK1/2, que se activaba como mecanismo de resistencia, podría ser una estrategia altamente efectiva para el tratamiento de pacientes con LMA que presenten mutaciones en dicho receptor, y además podría retrasar o evitar el desarrollo de resistencias a los TKIs.

### **5.2.2. ESTUDIO DE LA EFECTIVIDAD DE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA ERK1/2 EN MONOTERAPIA O EN COMBINACIÓN EN MODELOS *IN VITRO* DE LMA CON FLT3 MUTADO.**

De los inhibidores de la vía ERK1/2 disponibles, trametinib se ha evaluado en ensayos clínicos para pacientes con LMA que presentan mutaciones en *RAS* mostrando buenos resultados<sup>123</sup>. Y, además, ha mostrado un buen perfil de efectividad en modelos de resistencia farmacológica a otros inhibidores tirosina quinasa como pazopanib, en sarcoma sinovial<sup>218</sup> o gilteritinib en modelos de LMA con mutaciones en *RAS*<sup>167</sup>.

Por ello, en este trabajo se planteó si la inhibición de ERK1/2, a través de su molécula reguladora MEK1/2 podría superar la resistencia a los TKIs, ya que algunos inhibidores de MEK han demostrado ser útiles para potenciar las respuestas a TKIs en estudios previos<sup>163,167,219</sup>.

De acuerdo con ello, se caracterizó el efecto del inhibidor de MEK1/2, trametinib, en los modelos *in vitro* de la enfermedad. Así, se observó que trametinib mantenía la efectividad en las condiciones de sensibilidad, y en especial, también durante la resistencia a TKI, en ausencia de mutaciones en la vía MAPK.

La actividad de trametinib frente a blastos resistentes a TKI sugería una posible utilidad del inhibidor en combinación con los inhibidores de FLT3 para prevenir el desarrollo de resistencias farmacológicas. Por ello, se evaluó el sinergismo presente entre trametinib y los TKIs sorafenib y midostaurina en el modelo *in vitro* sensible a TKI (MOLM-13) para buscar la combinación que resultara más beneficiosa. Pues de encontrar una combinación de inhibidores de MEK con inhibidores de FLT3 tolerable, podría presentar un gran impacto clínico.

Los resultados *in vitro* mostraron que sorafenib fue más potente que midostaurina en la inhibición de *FLT3*-ITD, y que la combinación de sorafenib con trametinib fue bastante sinérgica. De hecho, un ensayo clínico <sup>220,221</sup> ha evaluado el efecto de combinar ambos fármacos en pacientes con cáncer hepatocelular avanzado (NCT02292173), mostrando un buen perfil de seguridad. Pero, aunque sorafenib ha mostrado resultados alentadores en ensayos clínicos para el tratamiento de la LMA <sup>222,223</sup>, no se ha aprobado aún.

Por otro lado, mientras que la adición de sorafenib a la quimioterapia estándar de tratamiento en la LMA no ha mejorado la supervivencia global, la adición de midostaurina ha resultado en un beneficio significativo de la supervivencia global <sup>224</sup> y mejor tolerancia que sorafenib <sup>82</sup>. Estos resultados han liderado la aprobación de midostaurina para el tratamiento de pacientes de LMA con mutaciones en *FLT3*.

En este aspecto, además, los experimentos presentados en este trabajo demostraron que la combinación de midostaurina con trametinib en el modelo *in vitro* sensible MOLM-13 presentó, en su mayoría, valores de sinergia más potentes ( $CI \leq 0,5$ ) que los observados con la combinación de sorafenib y trametinib.

El bloqueo concomitante de las vías de señalización ERK1/2 y *FLT3* puede proporcionar beneficios clínicos para el tratamiento de un set de pacientes con LMA, como se ha sugerido previamente <sup>163,219,225</sup>. En concreto, el autor Nishioka C. y colaboradores <sup>219</sup>, estudiaron el efecto de la combinación de un inhibidor de *FLT3* (sunitinib) con un inhibidor de MEK (AZD6244), demostrando que inhibe el crecimiento de manera sinérgica en dos modelos celulares de LMA con mutaciones *FLT3*-ITD, MOLM-13 y MV-4-11, por lo que sugieren que esta combinación podría ser una estrategia terapéutica prometedora en pacientes que porten mutaciones en *FLT3*.

Los efectos funcionales derivados de la combinación de los inhibidores de *FLT3* (sorafenib o midostaurina) y el inhibidor de MEK trametinib fueron evaluados en esta tesis mediante electrotransferencia en la línea MOLM-13. De este modo, se cuantificó la fosforilación de las proteínas dianas de las tres vías de señalización subyacentes a *FLT3*, fosfo-ERK1/2, fosfo-AKT y fosfo-STAT5. Estos hallazgos pusieron en evidencia que la combinación de midostaurina con trametinib inhibió potentemente la señalización de las tres vías, hecho que no ocurría con la combinación de sorafenib y trametinib, pues no inhibía de manera significativa la señalización de AKT.

Para comprobar que los efectos de estas combinaciones se mantenían en el contexto de resistencia, este mismo experimento se replicó en MOLM-13\_R20nMS, donde se observó lo mismo que en la línea parental MOLM-13.

Únicamente la combinación de midostaurina con trametinib mantuvo la inhibición significativa de las tres vías de señalización subyacentes a FLT3. Mientras que la combinación de sorafenib con trametinib falló de nuevo en la inhibición significativa de fosfo-AKT en el modelo resistente.

Probablemente, este escape en la inhibición podría actuar como un posible mecanismo de resistencia futuro a la combinación de sorafenib y trametinib, pues cabe recordar que la activación de la vía PI3K/AKT también se ha descrito como un mecanismo de resistencia a sorafenib en LMA <sup>70</sup>.

En resumen, la combinación de midostaurina con trametinib fue la única capaz de inhibir, tanto en el modelo *in vitro* de sensibilidad como en el modelo de resistencia a los inhibidores de FLT3, las vías subyacentes a la activación del receptor FLT3, todas ellas descritas como posibles mecanismos de resistencia farmacológica <sup>160,170,225–228</sup>.

Finalmente se comprobó que la combinación de midostaurina con trametinib mantenía los efectos de sinergia fuerte ( $CI \leq 0,5$ ) en el modelo *in vitro* de resistencia a TKI, MOLM-13\_20nMS, evidenciando una vez más la posible utilidad de la combinación en las resistencias farmacológicas a los inhibidores de FLT3.

En este sentido, los resultados presentados continuaron en línea con las sugerencias de diversos autores, quienes ponen de manifiesto que la combinación de inhibidores de FLT3 con inhibidores de la vía ERK1/2 en células de LMA con *FLT3*-ITD podría ser una buena estrategia para superar las resistencias farmacológicas a los inhibidores de FLT3<sup>131,163</sup>. Y con aquellos que han demostrado que la combinación de trametinib con otro FLT3i (gilteritinib) sería útil para superar las resistencias a FLT3i derivadas de la presencia de mutaciones en *NRAS* <sup>167</sup>.

### **5.2.3. EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA ERK1/2 EN MONOTERAPIA O EN COMBINACIÓN CON LOS FLT3I EN MODELOS *IN VITRO* DE LMA SIN MUTACIONES EN *FLT3*.**

El estudio que ha liderado la aprobación de midostaurina a nivel clínico para pacientes de LMA con mutaciones en el gen *FLT3*, RATIFY (NCT00651261) ha incluido a pacientes con mutaciones en *FLT3* de tipo TKD o ITD, pero no a pacientes que no presentan mutaciones en el gen <sup>106</sup>. Por el contrario, otros estudios (NCT00045942), han incluido a pacientes con *FLT3* no mutado y sugieren que midostaurina puede resultar útil ante la presencia del gen *FLT3* en su forma salvaje <sup>107</sup>.

No obstante, los trabajos publicados hasta la fecha realizados en humanos no demuestran de manera consistente que midostaurina genere mejores respuestas en pacientes que presentan o no mutaciones en el gen *FLT3*<sup>82</sup>.

A raíz del último ensayo mencionado, se piensa que la respuesta a midostaurina de los pacientes que no presentan mutaciones en el gen puede reflejar: 1) el papel que desempeña la sobre-expresión del gen no mutado (*wildtype*), *FLT3*-WT, como han descrito diversos autores<sup>63,65</sup>; o 2) el efecto antileucémico de midostaurina en otras dianas que no son únicamente el receptor FLT3 derivado de su actividad multidiana<sup>105,106</sup>.

Por todo ello, la utilidad de emplear midostaurina para el tratamiento clínico de pacientes con LMA que no presentan mutaciones en *FLT3* está siendo evaluada en un ensayo clínico (NCT03512197), del cual no se publicarán los resultados finales hasta el año 2026<sup>86</sup>.

A fin de estudiar la posible utilidad de combinar los inhibidores de MEK y de FLT3 en un contexto de LMA sin mutaciones en *FLT3*, se generó un modelo *in vitro* de resistencia a midostaurina empleando la línea OCI-AML3. Este nuevo modelo de resistencia (OCI-AML3\_ R5μMM) presentó al igual que el modelo *in vitro* de resistencia con fondo genético *FLT3*-ITD, el aumento en la fosforilación de la proteína ERK1/2 en comparación con su línea celular parental. De este modo, se demostró por primera vez que la activación de la vía MAPK suponía un mecanismo común de resistencia a los inhibidores de FLT3, independientemente del estado mutacional del gen.

Por otro lado, se comprobó que el inhibidor de MEK, trametinib, mantenía la efectividad *in vitro* en el fondo genético no mutado para *FLT3*, con valores de IC50 en el rango picomolar, en línea con la actividad que ha mostrado previamente en otros cánceres que carecen de mutaciones en el gen<sup>127,128,218</sup>.

Sin embargo, como se ha descrito previamente para *FLT3 wildtype*<sup>82</sup> los dos inhibidores del receptor, sorafenib y midostaurina, mostraron eficacias inferiores a las presentadas en el modelo *FLT3*-ITD. Por un lado, sorafenib presentó un valor de IC50 más de 10000 veces superior en OCI-AML3<sup>WT/WT</sup> en comparación al mostrado para MOLM-13<sup>WT/ITD</sup>, mientras que en el caso de midostaurina esta diferencia fue únicamente de 16 veces.

No obstante, la combinación de estos inhibidores de FLT3 con trametinib presentó valores de sinergia fuerte, en especial, en la combinación de midostaurina con trametinib, donde la mayoría de las dosis combinadas ensayadas mostraron valores de índice de combinación menores o iguales a 0,5.

Además, la realización de un experimento de obtención de células potencialmente resistentes en menos de 48 horas demostró que en la línea celular OCI-AML3, la combinación de midostaurina con trametinib disminuía la supervivencia de las células proliferativas y vivas en comparación a la reducción observada con los tratamientos en monoterapia (midostaurina o trametinib). De esta manera, se comprobó *in vitro* que la combinación farmacológica propuesta (midostaurina con trametinib) podía retrasar la aparición de resistencias en la enfermedad.

Con todos estos resultados se evidenció que tanto las células leucémicas que presentaban mutaciones en *FLT3* como las que no las presentaban, eran sensibles a midostaurina, como se ha apuntado previamente en ensayos clínicos <sup>211</sup>. Además, la combinación de midostaurina con trametinib mostró efectos de sinergia fuerte ( $CI \leq 0,5$ ) *in vitro* tanto en OCI-AML3<sup>WT/WT</sup> como en MOLM-13<sup>WT/ITD</sup>, por lo que dicha estrategia farmacológica podría ser eficaz extendidamente en pacientes de LMA que presenten o no mutaciones en el gen *FLT3*, permitiendo su administración en un gran grupo de pacientes que se pudieran beneficiar de estas terapias dirigidas.

Y, además, la combinación mencionada podría retrasar la aparición de nuevas resistencias farmacológicas, de manera similar a la apreciada en la combinación de trametinib con los inhibidores de BRAF, dabrafenib o vemurafenib, en pacientes con melanoma metastásico que portan mutaciones en *BRAF* <sup>229</sup>.

#### **5.2.4. ESTUDIO DE LA EFECTIVIDAD Y SEGURIDAD DE LA INHIBICIÓN CONCOMITANTE DE LA VÍA ERK1/2 Y FLT3 EN MUESTRAS *EX VIVO* DE LMA.**

Como se ha comentado previamente en el bloque “5.1. Mecanismos de resistencia a citarabina” de esta discusión, es importante testar el efecto de los inhibidores o combinaciones farmacológicas en células blásticas de pacientes de LMA para corroborar que la eficacia observada *in vitro* se mantiene *ex vivo*, de la misma forma que es importante evaluar la toxicidad del tratamiento en progenitores hematológicos de donantes sanos.

Diversos grupos han recurrido a cócteles de citoquinas para promover el crecimiento *ex vivo* de muestras de pacientes con LMA <sup>230</sup>. En este bloque del trabajo, se emplearon muestras de pacientes con LMA en fresco, es decir, dentro de las 24 horas posteriores a la obtención de la muestra. Por ello, para fomentar el crecimiento de las células blásticas, se aplicó un cóctel personalizado que promovía el mantenimiento de blastos *ex vivo* durante un periodo de al menos 72 horas.

De manera interesante, bajo estas condiciones, se observó que los valores de IC50 obtenidos *in vitro* se correlacionaban con los adquiridos en un contexto *ex vivo* de la enfermedad. Así, se demostró que la combinación de midostaurina con trametinib fue también sinérgica *ex vivo*, contemplando que la reducción de las dosis empleadas de cada fármaco permitía mantener los mismos niveles de toxicidad que se observaban si estos se empleaban por separado.

Y este hecho fue de especial interés, al tener cuenta, además, que de las muestras de LMA empleadas, tres de ellas correspondían a un contexto genético *FLT3* y *RAS* salvaje, mientras que dos de ellas presentaban mutaciones en *RAS*, de las cuales una, también presentaba mutaciones en el gen *FLT3*. En particular, con esta diversidad genética entre los pacientes, aunque el tamaño muestral no era el más idóneo, no se observaron diferencias respecto a la efectividad y sinergia de las combinaciones atendiendo al perfil mutacional de cada uno de esos 5 pacientes.

Por lo que se podría concluir que la combinación de midostaurina con trametinib resultó eficaz y sinérgica tanto en ausencia de mutaciones en *FLT3* o *RAS*, como en presencia de mutaciones en alguno de estos dos genes, o en ambos.

Cabe mencionar que algunos grupos han determinado la utilidad de emplear inhibidores duales de ambas vías. De hecho, un inhibidor dual de *FLT3* y *MEK*, E2601, ha sido evaluado en un ensayo clínico fase I/IIa para la LMA (NCT02418000) <sup>4</sup>. Y aunque esta estrategia podría resultar prometedora, se sabe que controlar la tolerabilidad y toxicidad de un fármaco único con actividad dual puede ser más complicado que si se usaran ambos fármacos por separado. Además, establecer las dosis efectivas para ambas inhibiciones en base a una única molécula es complicado. Por todo ello, este inhibidor dual no ha mostrado efectividades suficientes y su investigación ha sido discontinuada.

Por otro lado, la cuantificación de las colonias de progenitores mieloides CD34+ expuestas a distintas dosis de midostaurina con trametinib, permitió observar lo mismo que en la combinación de venetoclax con H3B-8800. Las mismas dosis farmacológicas en combinación de midostaurina y trametinib que permitían la inhibición del crecimiento de células blásticas de pacientes de LMA, no afectaron al crecimiento de células progenitoras CD34+ procedentes de donantes sanos.

De modo que, la combinación de los inhibidores de *FLT3* con los inhibidores de *MEK* permitiría reducir las dosis de ambos fármacos necesarias para alcanzar una toxicidad concreta en células leucémicas, pero a su vez, disminuiría los efectos tóxicos indeseados de cada uno de ellos, como consecuencia de la sinergia observada entre ambos compuestos <sup>208</sup>.

Además, en base a los resultados expuestos se pudo asegurar que la combinación del inhibidor de FLT3, midostaurina, con el inhibidor de MEK, trametinib, fue eficaz para el tratamiento de LMAs independientemente del estado mutacional del gen *FLT3*, como sugería el efecto de midostaurina en pacientes que no presentaban mutaciones en *FLT3*<sup>107</sup>.

Y, además, en los experimentos presentados, esta combinación fue segura, pues no presentó efectos de mielotoxicidad en células progenitoras de médula ósea, definidos por la reducción de colonias progenitoras mieloides <sup>209</sup>.

### **5.2.5. EVALUACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE TRAMETINIB CON MIDOSTAURINA EN UN MODELO MURINO *IN VIVO* DE LMA.**

La empleabilidad del inhibidor de MEK, trametinib, ha sido previamente estudiada en modelos murinos de LMA <sup>77</sup>. De hecho, su efectividad en el tratamiento de pacientes con la patología que presentan mutaciones en *RAS* ha sido evaluada en un ensayo clínico en fase I/II <sup>123</sup>. Y, a nivel clínico, el fármaco está aprobado para su uso en combinación con dabrafenib (inhibidor de B-Raf) para el tratamiento de melanoma metastásico con mutaciones en *BRAF* V600E o V600K y para el tratamiento de pacientes con cáncer metastásico de pulmón de células no pequeñas con mutaciones en *BRAF* V600E <sup>120</sup>.

Por su parte, el uso del inhibidor de FLT3, midostaurina, también ha sido previamente analizado en modelos *in vivo* de la enfermedad, pero con fondo genético *FLT3*-ITD <sup>175</sup>. Y, como se ha explicado previamente, midostaurina está aprobado para su uso en combinación con quimioterapia para el tratamiento de pacientes con LMA que presentan mutaciones en *FLT3* <sup>106</sup>.

Por lo que, como ambos compuestos están aprobados para su uso clínico, no era necesario testar su seguridad en monoterapia, pero sí en combinación, porque no había ninguna información al respecto en el contexto de enfermos con LMA u otros cánceres.

Algunos autores han estudiado el efecto de la combinación de los inhibidores de FLT3 y MEK en modelos *in vivo* de pez cebra injertados <sup>231</sup>, mostrando efectos similares a los observados en modelos murinos en un periodo de tiempo más estrecho. Sin embargo, la utilidad de estos modelos presenta la gran limitación de la escasez en la obtención de tejidos para estudios posteriores, así como la imposibilidad de identificar una sintomatología parecida a la apreciada en pacientes con LMA.

Otros grupos han descrito que la combinación de inhibidores de FLT3 y MEK logra reducir la carga leucémica en modelos murinos de LMA, aunque, de nuevo, en un contexto *FLT3-ITD*<sup>163</sup>. Pero, hasta el momento, no existían estudios que evaluaran la supervivencia asociada a esta estrategia de tratamiento *in vivo*, y menos aún en un contexto salvaje para el gen *FLT3*. Por ello, en este trabajo se llevó a cabo el estudio de la efectividad de midostaurina, trametinib y su combinación en un modelo murino de LMA con células OCI-AML3 injertadas.

Los resultados previamente expuestos demostraron que la combinación de estos dos fármacos *in vivo* en un modelo de LMA resultaba en mejoras de la supervivencia global estadísticamente significativas en comparación con los grupos de tratamiento control y de monoterapia (midostaurina o trametinib).

Asimismo, los experimentos realizados en los cortes de esternón evidenciaron que todos los animales sacrificados ante la presencia de signos de leucemia presentaron infiltración de médula ósea con la línea celular empleada, OCI-AML3. Con la única excepción de un ratón perteneciente al grupo tratado con la combinación, que serviría como ejemplo de que la combinación de midostaurina con trametinib pudo retrasar la aparición de resistencias farmacológicas en la enfermedad.

Por otro lado, hay que explicar que la leucemia mieloide aguda no solo se presenta como una alteración en la médula ósea, sino que también puede presentarse, aunque en menor frecuencia, como un sarcoma mieloide. Los sarcomas mieloides consisten en una tumoración extramedular constituida por células mieloides inmaduras o mieloblastos, que se pueden localizar en cualquier parte del cuerpo, con mayor frecuencia a nivel de la piel, ganglios linfáticos, tracto gastrointestinal, hueso, tejido blando o testicular<sup>11</sup>.

Para emplearlo a modo de comparación, aunque no es una situación equivalente pues la frecuencia de aparición de los sarcomas mieloides es bastante baja en humanos, cabe mencionar que en los modelos animales se identificó la presencia de tumores extramedulares en diferentes tejidos en el momento de la realización de las necropsias, al igual que han evidenciado otros autores en modelos murinos similares<sup>132</sup>.

La existencia de estos tumores extramedulares en los ratones denotaba el fallo del tratamiento correspondiente, pues ponía en evidencia que las células malignas habían encontrado la manera de evadir el mecanismo de actuación del fármaco empleado en cada caso y pudieron proliferar en otro tejido, a parte de la propia médula ósea.

En este aspecto, la presencia de tumores extramedulares en bazo, hígado y vejiga urinaria se apreció en todos los grupos de tratamiento a excepción de los animales tratados con la combinación farmacológica de midostaurina y trametinib.

Como resumen de esta parte se concluyó que la activación de la vía de señalización ERK1/2 era un mecanismo de resistencia relevante en LMA tras el tratamiento con los inhibidores de FLT3, tanto si se presentan o no mutaciones en el gen *FLT3*. Los resultados expuestos proporcionaron evidencias claras del beneficio terapéutico de la combinación de midostaurina con trametinib, no solo en pacientes con mutaciones en *FLT3*, como se ha sugerido previamente <sup>163</sup>, sino también en aquellos pacientes que no presentaron mutaciones en el gen. Esta combinación demostró ser sinérgica *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. En el último contexto la combinación además incrementó la supervivencia de los modelos animales de la enfermedad.

En general, estos datos apoyarían la evaluación de la combinación de midostaurina y trametinib para el tratamiento de pacientes con LMA, independientemente del estado de *FLT3* en un ensayo clínico, lo cual incrementaría el rango de pacientes que podrían beneficiarse de la combinación farmacológica.

Igualmente, este estudio mostraba que el aumento de la expresión de fosfo-ERK1/2 podría emplearse como un biomarcador de respuesta a los tratamientos con FLT3i. Esto explicaba que trametinib no fuera solo beneficioso en el contexto de sensibilidad, si no también durante la resistencia farmacológica a los inhibidores de FLT3. Y, que, además la combinación de midostaurina con trametinib ayudara a prevenir el desarrollo de resistencia incluso con fondo genético salvaje del gen. Aun así, se necesitarían más estudios para explorar las rutas que puedan estar involucradas en los mecanismos de resistencia a la combinación propuesta, para facilitar la implantación de distintas estrategias de prevención.

Desgraciadamente, a pesar de la evidencia científica que se ha acumulado a nivel preclínico, no solo en esta tesis, sino también en los numerosos estudios referenciados a lo largo de este trabajo, actualmente, los inhibidores de FLT3 se están testando en combinación con diversos fármacos como quimioterapia estándar e hipometilantes, bortezomib (inhibidor del proteasoma), atezolizumab (anticuerpo anti-PD-L1), venetoclax (inhibidor de Bcl-2), milademetal (inhibidor de MDM2) y homoharringtonine (inhibidor de STAT) <sup>134</sup>, pero no con inhibidores de la vía ERK1/2, como se propone en base a los resultados expuestos.

## 5.3. TRASLACIÓN CLÍNICA DE LOS RESULTADOS

### 5.3.1. **ESTRATIFICACIÓN PRONÓSTICA DE LA ENFERMEDAD.**

A pesar del conocimiento aumentado de las bases moleculares de la enfermedad y la resistencia farmacológica, solo se han incluido una pequeña porción de biomarcadores para predecir el pronóstico de los pacientes y ayudar a la toma de decisiones terapéuticas en las guías de la ELN <sup>133</sup>. Pero estas guías, aunque resultan complejas de manejar deberían ser incluso más amplias.

Para dar sentido a la cantidad de información de la que se dispone sobre la enfermedad, es importante identificar (1) todas las anomalías moleculares que definen la LMA y distinguen las distintas entidades biológicas de la enfermedad; (2) las anomalías que pueden surgir a consecuencia de la resistencia a los tratamientos empleados a nivel clínico; disponer de (3) estudios específicos para la estratificación del riesgo / beneficio de determinados tratamientos; (4) un amplio abanico de fármacos aprobados para su uso clínico que permitan dar un tratamiento personalizado a cada entidad.

En muchas ocasiones, los pacientes que acuden al hospital necesitan un tratamiento urgente, y es prácticamente imposible disponer de todos los estudios moleculares antes de empezar el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, en los casos menos agudos, la correcta estratificación del riesgo ha mostrado que permite mejorar claramente las respuestas obtenidas en los pacientes.

Algunos autores <sup>114,232</sup> muestran que esperar alrededor de una semana antes de comenzar el tratamiento para tener todos los resultados disponibles no ha alterado la supervivencia global en comparación a los pacientes que recibieron tratamiento instantáneamente. De hecho, el riesgo que se asume por la espera de los resultados es menor que el riesgo asociado a emplear una terapia que no va a beneficiar al paciente<sup>233</sup>.

En especial, la LMA permite la posibilidad de trabajar fácilmente con muestras *ex vivo* de pacientes sin necesidad de realizar tomas de muestras más invasivas, como ocurre con la obtención de biopsias para el diagnóstico de otros tumores. Esto permite agilizar el estudio de la sensibilidad farmacológica o de los mecanismos de resistencia derivados del empleo de distintos fármacos a nivel clínico <sup>141</sup>.

En muchas ocasiones, el empleo de muestras *ex vivo* ha resultado útil en la LMA para determinar qué tratamientos pueden resultar beneficiosos en pacientes concretos, como describen Hyrenius-Wittsten A. y colaboradores <sup>234</sup>. Por lo que si se establecieran en la clínica estrategias similares podría mejorarse la predicción de las respuestas farmacológicas.

En este trabajo se propone el empleo de muestras *ex vivo* para la cuantificación de los niveles de las proteínas SR fosforiladas para determinar la sensibilidad farmacológica a citarabina mediante inmunohistoquímica. Asimismo, la cuantificación de los niveles de la proteína fosfo-ERK1/2 en muestras *ex vivo*, mediante inmunohistoquímica tras el tratamiento, puede resultar útil para evaluar la respuesta a los inhibidores de FLT3.

Igualmente, la determinación de la efectividad farmacológica de las combinaciones de H3B-8800 con venetoclax o midostaurina con trametinib podría ser cómodamente evaluada con el empleo de muestras *ex vivo* de los pacientes con LMA.

De este modo en una enfermedad tan agresiva como la LMA el empleo de fármacos menos tóxicos y más específicos beneficiaría claramente a los pacientes, quienes en su mayoría son ancianos que padecen patologías de distinta índole. Quizá, en el futuro, la LMA podría curarse con el uso de tratamientos dirigidos y posiblemente, incluso sin necesidad de emplear la quimioterapia <sup>104</sup>. Aunque cabe recordar que las terapias personalizadas son sólo posibles si se asume que una terapia única para la LMA nunca será suficiente, sino que más bien, cada LMA concreta necesitará un abordaje terapéutico específico.

Y todo esto es muy importante tenerlo en mente, sobre todo, si se considera que han pasado 20 años desde que se descubrieron las primeras alteraciones en el receptor FLT3 y la aplicación de fármacos dirigidos a él en el tratamiento clínico para la LMA <sup>134</sup>. Y, que, a pesar de que parecían bastante prometedores, los mecanismos de resistencia a estos inhibidores se han ido dilucidando simultáneamente a su aplicación, demostrando que una estrategia de tratamiento basada únicamente en la inhibición de una diana (en este caso FLT3) no parece ser suficiente para curar la enfermedad.

Si, además, se le añade la heterogeneidad característica de la LMA se debería contar con un amplio abanico de posibilidades terapéuticas si se quiere hablar de terapias “curativas” que permitan cronificar el curso de la enfermedad aportando una calidad de vida aceptable a los pacientes.

### 5.3.2. EMPLEABILIDAD DE LOS TRATAMIENTOS EN COMBINACIÓN.

La resistencia farmacológica a los tratamientos empleados para la LMA de momento permanece como el fallo más importante de ellos, como se ha ido describiendo a lo largo de este trabajo. De hecho, incluso los fármacos dirigidos que se proponen para su uso combinado en LMA y que están aprobados (como venetoclax, trametinib), ya han mostrado su susceptibilidad al desarrollo de resistencias farmacológicas.

Por su parte, H3B-8800, no está aprobado para el tratamiento de ninguna patología, por lo que de momento no se han descrito mecanismos de resistencia farmacológica.

En el caso de venetoclax, algunos pacientes tratados en combinación con bajas dosis de citarabina o agentes hipometilantes han empezado a mostrar diferentes mecanismos de resistencia, evidenciando que dicha combinación, aunque es efectiva, no es perfecta<sup>207</sup>.

Como mecanismos de resistencia farmacológica se han descrito la selección de una población sub-clonal con mutaciones en *IDH2*, *CBL* o *NRAS*<sup>207</sup>, o en *FLT3* y *PTPN11*<sup>1235</sup>. Pero también se han asociado las mutaciones en *TP53* con baja eficacia de la combinación<sup>125</sup>. Y, además, otros autores han observado la activación de fosfo-ERK1/2 como un mecanismo de resistencia a venetoclax, porque existe un incremento de la proteína fosforilada dependiente de la concentración del fármaco<sup>124</sup>.

En cuanto a la posibilidad de generar resistencias al tratamiento con inhibidores de MEK, el grupo de Casado P. y colaboradores<sup>193</sup> describe en su trabajo que se pueden dar dos mecanismos de resistencia intrínseca a inhibidores de MEK. Uno ocurre en las células que no son adictas a la pro-supervivencia porque tienen baja actividad de la vía RAS/MEK/ERK; la otra ocurre en células que, aunque tengan alta actividad de RAS/MEK/ERK, superan la inhibición de MEK mediante el eje de activación FLT3/STAT5, una vía que actúa en paralelo a la vía RAS/MEK/ERK<sup>193</sup>.

Además, en este trabajo se ha puesto de manifiesto las alteraciones funcionales en la maquinaria del corte y empalme del ARN mensajero como mecanismo de resistencia farmacológica a citarabina, y la sobre-activación de ERK1/2 como mecanismo de resistencia a los inhibidores de FLT3.

Todas estas situaciones no hacen más que reforzar que el empleo de combinaciones farmacológicas permanece como la mejor estrategia para evadir, retrasar o superar la aparición de resistencias farmacológicas en la enfermedad.

La presencia de un mecanismo de resistencia conocido a un nuevo agente terapéutico al inicio de la terapia sugiere que puede existir un beneficio si se aplican varios fármacos en combinación desde el diagnóstico <sup>233</sup>.

En resumen, como se ha ido describiendo, los mecanismos de resistencia a citarabina, y a los inhibidores de FLT3, MEK y Bcl-2 refuerzan la posibilidad de emplear distintas combinaciones de ellos. Pues, aunque no ha sido objeto de este trabajo, por ejemplo, una combinación triple de los inhibidores de FLT3, el inhibidor de MEK y el inhibidor de Bcl-2 podría resultar particularmente interesante si se tiene en cuenta que:

1) Las alteraciones del receptor tirosina quinasa *FLT3*, ya sean mutaciones o sobreexpresión en ausencia de mutaciones, son el mecanismo molecular más ampliamente observado en los pacientes de LMA <sup>67</sup>. La presencia de mutaciones *FLT3*-ITD promueve la resistencia a citarabina a través de la señalización de *RUNX3* <sup>144</sup>. Asimismo, las mutaciones en el gen se han vinculado con resistencias a los inhibidores de FLT3 <sup>103,134,135,164</sup> y al tratamiento con venetoclax <sup>124</sup>. Y, la activación del eje FLT3/STAT5 se ha descrito como mecanismo de resistencia a los inhibidores de MEK <sup>193</sup>.

2) Las mutaciones en *NRAS* se presentan en un número importante de pacientes con LMA <sup>77</sup>, y se han vinculado con las resistencias farmacológicas a los inhibidores de FLT3 en pacientes que presentan *FLT3* mutado <sup>111,165,167</sup>. Además, en este trabajo se demostró que la activación de ERK1/2 suponía un mecanismo de resistencia farmacológica a los inhibidores de FLT3 también en *FLT3 wildtype*, y no sólo en *FLT3* mutado como han descrito otros grupos <sup>131,132,163,169,170</sup>. Al igual que también se ha vinculado su activación con la resistencia farmacológica a venetoclax <sup>124</sup>.

3) Por otro lado, las células resistentes a quimioterapia activan mecanismos protectores como la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 <sup>84</sup>. La hiper-activación de ERK1/2 puede regular la actividad de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 entre otras <sup>122,236</sup>. Y, la señalización de algunas de las proteínas SR más alteradas en la enfermedad descritas en este trabajo, como SRRM2, interviene en la regulación también de Bcl-2 <sup>186</sup>.

De modo que, surgen varias dianas interesantes en la enfermedad, que podrían derivar de las resistencias farmacológicas: FLT3, ERK1/2 y Bcl-2. Asimismo, los buenos resultados observados con venetoclax a nivel clínico <sup>207</sup> hacen cuestionarse si los pacientes de LMA con mutaciones sujetas a otros tratamientos, podrían beneficiarse además del empleo de esos fármacos dirigidos con el correspondiente ajuste de dosis <sup>125</sup>. Por ello se está despertando gran interés en el empleo de venetoclax con otros esquemas de tratamiento.

En concreto, varios ensayos clínicos están evaluando la utilidad de emplear venetoclax en combinación con los inhibidores de FLT3, quizartinib (NCT03735875), o gilteritinib (NCT03625505), o además con azacitidina (NCT04140487, con gilteritinib) o decitabina (NCT03661307, con quizartinib). Se espera que estas combinaciones permitan aumentar la duración de las remisiones y la supervivencia <sup>125</sup>.

Adicionalmente, otros investigadores han publicado recientemente resultados prometedores derivados de la combinación de venetoclax con el inhibidor de MEK, cobimetinib, en modelos murinos de LMA, demostrando que la combinación reduce la carga leucémica en ratones injertados con MOLM-13 o con OCI-AML3 <sup>237</sup>.

Estos resultados refuerzan el interés de combinar venetoclax con los distintos inhibidores de MEK, cobimetinib (NCT02670044), o trametinib junto a azacitidina (NCT04487106) para el tratamiento de pacientes con LMA.

Por todo ello, de realizarse la combinación de tres inhibidores de este tipo (venetoclax, trametinib y midostaurina) podría suponer una estrategia prometedora para retrasar la aparición de resistencias farmacológicas en el curso de la enfermedad. No obstante, se necesitarían estudios para valorar el uso de una combinación triple de los inhibidores de FLT3, Bcl-2, y MEK en LMA.



# 6. CONCLUSIONES



Las conclusiones principales extraídas de este trabajo se enumeran a continuación.

1. Las alteraciones en la expresión génica de *SRSF9*, *SRSF12*, y en particular de *SRRM2*, parecen estar vinculadas a la patogenia de la leucemia mieloide aguda, pero no al desarrollo de resistencia al tratamiento con citarabina. Por el contrario, los cambios post-traduccionales observados en las proteínas SR están implicados en la evasión de la respuesta farmacológica al compuesto.

De manera similar, la activación de la vía de supervivencia ERK1/2, derivada del aumento de fosforilación de la proteína, está implicada en la falta de respuesta a los inhibidores tirosina quinasa en pacientes de LMA que portan mutaciones en *FLT3*.

2. Se ha validado el aumento en los niveles de proteínas SR fosforiladas en relación con el fallo de la funcionalidad del espliceosoma, de manera que constituye un mecanismo de resistencia a los esquemas de tratamiento basados en citarabina.

En cuanto a resistencias a los inhibidores tirosina quinasa, se ha validado la hiperactivación de ERK1/2 *ex vivo* en pacientes de LMA que presentan mutaciones en *FLT3*. Adicionalmente, se ha demostrado, *in vitro*, que su actividad supone un mecanismo de resistencia a TKI independiente del estado mutacional del gen.

3. En base a los resultados presentados en este trabajo, se postula la cuantificación de la fosforilación de las proteínas SR como un biomarcador predictivo de la respuesta a citarabina.

En cambio, el incremento de fosforilación de ERK1/2 podría vincularse a la falta de efectividad de los tratamientos basados en la inhibición del receptor FLT3.

4. La inhibición del proceso de corte y empalme del ARN mensajero se muestra como una diana farmacológica en los contextos de LMA sensible o resistente a citarabina. Igualmente, la inhibición del proceso en combinación con fármacos aprobados para la enfermedad podría representar una buena estrategia terapéutica *in vitro*.

Asimismo, la inhibición de ERK1/2 en solitario o concomitante con el bloqueo del receptor FLT3 constituye una diana farmacológica para el tratamiento de la LMA sensible o resistente a los TKI, sin importar el estado mutacional de *FLT3*. Más aún, se ha demostrado que esta inhibición dual actúa como una terapia preventiva del desarrollo de resistencias.

5. La combinación del inhibidor del *splicing*, H3B-8800, con el inhibidor de Bcl-2, venetoclax, es efectiva y sinérgica en muestras *ex vivo* de pacientes con LMA, además de segura en progenitores hematológicos de donantes sanos. Así pues, se propone su uso simultáneo como una aproximación terapéutica en la enfermedad.

Análogamente, la combinación del inhibidor de FLT3, midostaurina, con el inhibidor de la vía ERK1/2, trametinib, es eficaz y sinérgica en muestras *ex vivo* de la enfermedad, a la par que segura en progenitores hematológicos de donantes sanos. De manera destacable, la combinación de midostaurina y trametinib puede incrementar el tiempo de supervivencia global *in vivo*, como se ha demostrado en modelos murinos de la enfermedad.

# 7. BIBLIOGRAFÍA



1. Short, N. J., Rytting, M. E. & Cortes, J. E. Acute myeloid leukaemia. *Lancet Lond. Engl.* **392**, 593–606 (2018).
2. Döhner, H., Weisdorf, D. J. & Bloomfield, C. D. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1136–1152 (2015).
3. Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A., Ma, X. & Zeidan, A. M. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev.* **36**, 70–87 (2019).
4. Yuan, T. *et al.* Dual FLT3 inhibitors: Against the drug resistance of acute myeloid leukemia in recent decade. *Eur. J. Med. Chem.* **178**, 468–483 (2019).
5. Papaemmanuil, E. *et al.* Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **374**, 2209–2221 (2016).
6. Montalban-Bravo, G. & Garcia-Manero, G. Novel drugs for older patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* **29**, 760–769 (2015).
7. McKenzie, M. D. *et al.* Interconversion between Tumorigenic and Differentiated States in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Stem Cell* **25**, 258-272.e9 (2019).
8. Cheson, B. D. *et al.* Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 4642–4649 (2003).
9. Staudt, D. *et al.* Targeting Oncogenic Signaling in Mutant FLT3 Acute Myeloid Leukemia: The Path to Least Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
10. Granfeldt Østgård, L. S. *et al.* Epidemiology and Clinical Significance of Secondary and Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia: A National Population-Based Cohort Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 3641–3649 (2015).
11. Merino, A. Clasificación de las leucemias agudas mieloides. *Rev. Lab. Clínico* **3**, 139–147 (2010).
12. Sakamoto, K. M. *et al.* Targeting novel signaling pathways for resistant acute myeloid leukemia. *Mol. Genet. Metab.* **114**, 397–402 (2015).
13. K Bhanumathy, K. *et al.* Protein Tyrosine Kinases: Their Roles and Their Targeting in Leukemia. *Cancers* **13**, (2021).
14. Redaelli, A., Lee, J. M., Stephens, J. M. & Pashos, C. L. Epidemiology and clinical burden of acute myeloid leukemia. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **3**, 695–710 (2003).
15. Miranda-Filho, A. *et al.* Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol.* **5**, e14–e24 (2018).

16. Aziz, H., Ping, C. Y., Alias, H., Ab Mutalib, N.-S. & Jamal, R. Gene Mutations as Emerging Biomarkers and Therapeutic Targets for Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Front. Pharmacol.* **8**, 897 (2017).
17. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016. *SEER* [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2016/index.html](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/index.html).
18. Duy, C. *et al.* Chemotherapy Induces Senescence-Like Resilient Cells Capable of Initiating AML Recurrence. *Cancer Discov.* **11**, 1542–1561 (2021).
19. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
20. Bennett, J. M. *et al.* Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br. J. Haematol.* **78**, 325–329 (1991).
21. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424–447 (2017).
22. Ley, T. J. *et al.* Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **368**, 2059–2074 (2013).
23. Lindsley, R. C. *et al.* Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood* **125**, 1367–1376 (2015).
24. Effenberger, K. A., Urabe, V. K. & Jurica, M. S. Modulating splicing with small molecular inhibitors of the spliceosome. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **8**, (2017).
25. Gonçalves, V., Pereira, J. F. S. & Jordan, P. Signaling Pathways Driving Aberrant Splicing in Cancer Cells. *Genes* **9**, (2017).
26. Wahl, M. C., Will, C. L. & Lührmann, R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**, 701–718 (2009).
27. Dvinge, H., Kim, E., Abdel-Wahab, O. & Bradley, R. K. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 413–430 (2016).
28. Lee, S. C.-W. & Abdel-Wahab, O. Therapeutic targeting of splicing in cancer. *Nat. Med.* **22**, 976–986 (2016).
29. Blencowe, B. J., Issner, R., Nickerson, J. A. & Sharp, P. A. A coactivator of pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* **12**, 996–1009 (1998).
30. Fontrodona, L. *et al.* RSR-2, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of human spliceosomal component SRm300/SRRM2, regulates development by influencing the transcriptional machinery. *PLoS Genet.* **9**, e1003543 (2013).
31. Dreyfuss, G., Kim, V. N. & Kataoka, N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 195–205 (2002).

32. Blencowe, B. J. *et al.* The SRm160/300 splicing coactivator subunits. *RNA N. Y.* **6**, 111–120 (2000).
33. Wagner, S., Chiosea, S., Ivshina, M. & Nickerson, J. A. In vitro FRAP reveals the ATP-dependent nuclear mobilization of the exon junction complex protein SRm160. *J. Cell Biol.* **164**, 843–850 (2004).
34. Hall, L. L., Smith, K. P., Byron, M. & Lawrence, J. B. Molecular anatomy of a speckle. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **288**, 664–675 (2006).
35. Tomsic, J. *et al.* A germline mutation in SRRM2, a splicing factor gene, is implicated in papillary thyroid carcinoma predisposition. *Sci. Rep.* **5**, 10566 (2015).
36. Gautam, A., Grainger, R. J., Vilardell, J., Barrass, J. D. & Beggs, J. D. Cwc21p promotes the second step conformation of the spliceosome and modulates 3' splice site selection. *Nucleic Acids Res.* **43**, 3309–3317 (2015).
37. Zanini, I. M. Y., Sonesson, C., Lorenzi, L. E. & Azzalin, C. M. Human cactin interacts with DHX8 and SRRM2 to assure efficient pre-mRNA splicing and sister chromatid cohesion. *J. Cell Sci.* **130**, 767–778 (2017).
38. Matera, A. G. & Wang, Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 108–121 (2014).
39. Zhou, Z. & Fu, X.-D. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma* **122**, 191–207 (2013).
40. Will, C. L. & Lührmann, R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
41. Shi, Y. Mechanistic insights into precursor messenger RNA splicing by the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 655–670 (2017).
42. Jeong, S. SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA. *Mol. Cells* **40**, 1–9 (2017).
43. Graveley, B. R. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA N. Y.* **6**, 1197–1211 (2000).
44. Visconte, V., Makishima, H., Maciejewski, J. P. & Tiu, R. V. Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematological disorders. *Leukemia* **26**, 2447–2454 (2012).
45. Czubaty, A. & Piekietko-Witkowska, A. Protein kinases that phosphorylate splicing factors: Roles in cancer development, progression and possible therapeutic options. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **91**, 102–115 (2017).
46. An, Y. *et al.* The nuclear GSK-3 $\beta$  regulated post-transcriptional processing of mRNA through phosphorylation of SC35. *Mol. Cell. Biochem.* **451**, 55–67 (2019).

47. Zhou, J. & Chng, W.-J. Aberrant RNA splicing and mutations in spliceosome complex in acute myeloid leukemia. *Stem Cell Investig.* **4**, 6 (2017).
48. Bonnal, S. C., López-Oreja, I. & Valcárcel, J. Roles and mechanisms of alternative splicing in cancer - implications for care. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **17**, 457–474 (2020).
49. Dvinge, H. & Bradley, R. K. Widespread intron retention diversifies most cancer transcriptomes. *Genome Med.* **7**, 45 (2015).
50. Welch, J. S. *et al.* The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* **150**, 264–278 (2012).
51. Gonçalves, V. *et al.* Phosphorylation of SRSF1 by SRPK1 regulates alternative splicing of tumor-related Rac1b in colorectal cells. *RNA N. Y. N* **20**, 474–482 (2014).
52. Gautrey, H. *et al.* SRSF3 and hnRNP H1 regulate a splicing hotspot of HER2 in breast cancer cells. *RNA Biol.* **12**, 1139–1151 (2015).
53. Kong, J. *et al.* Long non-coding RNA LINC01133 inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer by interacting with SRSF6. *Cancer Lett.* **380**, 476–484 (2016).
54. Pellagatti, A. & Boultonwood, J. Splicing factor mutant myelodysplastic syndromes: Recent advances. *Adv. Biol. Regul.* **75**, 100655 (2020).
55. Karni, R. *et al.* The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 185–193 (2007).
56. Jia, R., Li, C., McCoy, J. P., Deng, C.-X. & Zheng, Z.-M. SRp20 is a proto-oncogene critical for cell proliferation and tumor induction and maintenance. *Int. J. Biol. Sci.* **6**, 806–826 (2010).
57. Cohen-Eliav, M. *et al.* The splicing factor SRSF6 is amplified and is an oncoprotein in lung and colon cancers. *J. Pathol.* **229**, 630–639 (2013).
58. Jensen, M. A., Wilkinson, J. E. & Krainer, A. R. Splicing factor SRSF6 promotes hyperplasia of sensitized skin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 189–197 (2014).
59. Sciarrillo, R. *et al.* The role of alternative splicing in cancer: From oncogenesis to drug resistance. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **53**, 100728 (2020).
60. Adamia, S. *et al.* A genome-wide aberrant RNA splicing in patients with acute myeloid leukemia identifies novel potential disease markers and therapeutic targets. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 1135–1145 (2014).

61. Tolosa, A. Diagnóstico molecular de alteraciones en el gen FLT3: impacto clínico, retos y propuestas. *Genotipia* [https://genotipia.com/revista\\_gm/gmgo013-larrayoz-flt3/](https://genotipia.com/revista_gm/gmgo013-larrayoz-flt3/).
62. Ozeki, K. *et al.* Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood* **103**, 1901–1908 (2004).
63. Chen, C.-T. *et al.* Identification of a potent 5-phenyl-thiazol-2-ylamine-based inhibitor of FLT3 with activity against drug resistance-conferring point mutations. *Eur. J. Med. Chem.* **100**, 151–161 (2015).
64. Quentmeier, H., Reinhardt, J., Zaborski, M. & Drexler, H. G. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia* **17**, 120–124 (2003).
65. Kuchenbauer, F. *et al.* Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **90**, 1617–1625 (2005).
66. Griffith, J. *et al.* The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol. Cell* **13**, 169–178 (2004).
67. Annesley, C. E. & Brown, P. The Biology and Targeting of FLT3 in Pediatric Leukemia. *Front. Oncol.* **4**, 263 (2014).
68. Bernstein, I. D. & Delaney, C. Engineering stem cell expansion. *Cell Stem Cell* **10**, 113–114 (2012).
69. Breitenbuecher, F. *et al.* Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood* **113**, 4074–4077 (2009).
70. Lindblad, O. *et al.* Aberrant activation of the PI3K/mTOR pathway promotes resistance to sorafenib in AML. *Oncogene* **35**, 5119–5131 (2016).
71. Martínez-López, J. *et al.* Use of Sorafenib as an effective treatment in an AML patient carrying a new point mutation affecting the Juxtamembrane domain of FLT3. *Br. J. Haematol.* **158**, 555–558 (2012).
72. Stirewalt, D. L. *et al.* Novel FLT3 point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **124**, 481–484 (2004).
73. Reindl, C. *et al.* Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* **107**, 3700–3707 (2006).
74. Furitsu, T. *et al.* Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J. Clin. Invest.* **92**, 1736–1744 (1993).
75. Ikeda, H. *et al.* Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood* **78**, 2962–2968 (1991).

76. Marampon, F., Ciccarelli, C. & Zani, B. M. Biological Rationale for Targeting MEK/ERK Pathways in Anti-Cancer Therapy and to Potentiate Tumour Responses to Radiation. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
77. Burgess, M. R. *et al.* Preclinical efficacy of MEK inhibition in Nras-mutant AML. *Blood* **124**, 3947–3955 (2014).
78. Wang, S. *et al.* Mutational spectrum and prognosis in NRAS-mutated acute myeloid leukemia. *Sci. Rep.* **10**, 12152 (2020).
79. Liu, X. *et al.* RAS mutations in acute myeloid leukaemia patients: A review and meta-analysis. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **489**, 254–260 (2019).
80. DiNardo, C. D. *et al.* Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *N. Engl. J. Med.* **378**, 2386–2398 (2018).
81. Medeiros, B. C. *et al.* Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia* **31**, 272–281 (2017).
82. Bose, P., Vachhani, P. & Cortes, J. E. Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Curr. Treat. Options Oncol.* **18**, 17 (2017).
83. Qiu, J.-G. *et al.* Trametinib modulates cancer multidrug resistance by targeting ABCB1 transporter. *Oncotarget* **6**, (2015).
84. Moserle, L., Ghisi, M., Amadori, A. & Indraccolo, S. Side population and cancer stem cells: therapeutic implications. *Cancer Lett.* **288**, 1–9 (2010).
85. Ramos Perez, J. & Montalban-Bravo, G. Emerging drugs for the treatment of chronic myelomonocytic leukemia. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **25**, 515–529 (2020).
86. Burnett, A. & Stone, R. AML: New Drugs but New Challenges. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **20**, 341–350 (2020).
87. McMahon, C. M. & Perl, A. E. Management of primary refractory acute myeloid leukemia in the era of targeted therapies. *Leuk. Lymphoma* **60**, 583–597 (2019).
88. Grimwade, D., Ivey, A. & Huntly, B. J. P. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* **127**, 29–41 (2016).
89. Malani, D. *et al.* Enhanced sensitivity to glucocorticoids in cytarabine-resistant AML. *Leukemia* **31**, 1187–1195 (2017).
90. Saultz, J. N. & Garzon, R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *J. Clin. Med.* **5**, (2016).
91. Brandwein, J. M. Targeting polo-like kinase 1 in acute myeloid leukemia. *Ther. Adv. Hematol.* **6**, 80–87 (2015).
92. Abraham, A. *et al.* RNA expression of genes involved in cytarabine metabolism and transport predicts cytarabine response in acute myeloid leukemia. *Pharmacogenomics* **16**, 877–890 (2015).

93. Di Tullio, A. *et al.* The combination of CHK1 inhibitor with G-CSF overrides cytarabine resistance in human acute myeloid leukemia. *Nat. Commun.* **8**, 1679 (2017).
94. M, L., M, S., B, B. & Yg, A. Surmounting Cytarabine-resistance in acute myeloblastic leukemia cells and specimens with a synergistic combination of hydroxyurea and azidothymidine. *Cell Death Dis.* **10**, (2019).
95. Sallman, D. A. & Lancet, J. E. What are the most promising new agents in acute myeloid leukemia? *Curr. Opin. Hematol.* **24**, 99–107 (2017).
96. Kucukyurt, S. & Eskazan, A. E. New drugs approved for acute myeloid leukaemia in 2018. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **85**, 2689–2693 (2019).
97. Berg, M. G. *et al.* A quantitative high-throughput in vitro splicing assay identifies inhibitors of spliceosome catalysis. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 1271–1283 (2012).
98. Hatcher, J. M. *et al.* SRPKIN-1: A Covalent SRPK1/2 Inhibitor that Potently Converts VEGF from Pro-angiogenic to Anti-angiogenic Isoform. *Cell Chem. Biol.* **25**, 460-470.e6 (2018).
99. Pawellek, A. *et al.* Identification of small molecule inhibitors of pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* **289**, 34683–34698 (2014).
100. Steensma, D. P. *et al.* Phase I First-in-Human Dose Escalation Study of the oral SF3B1 modulator H3B-8800 in myeloid neoplasms. *Leukemia* (2021) doi:10.1038/s41375-021-01328-9.
101. Seiler, M. *et al.* H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers. *Nat. Med.* **24**, 497–504 (2018).
102. Short, N. J., Kantarjian, H., Ravandi, F. & Daver, N. Emerging treatment paradigms with FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Ther. Adv. Hematol.* **10**, 2040620719827310 (2019).
103. Kennedy, V. E. & Smith, C. C. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies. *Front. Oncol.* **10**, 612880 (2020).
104. Saleh, K., Khalifeh-Saleh, N. & Kourie, H. R. Acute myeloid leukemia transformed to a targetable disease. *Future Oncol. Lond. Engl.* **16**, 961–972 (2020).
105. Gallogly, M. M. & Lazarus, H. M. Midostaurin: an emerging treatment for acute myeloid leukemia patients. *J. Blood Med.* **7**, 73–83 (2016).
106. Levis, M. Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. *Blood* **129**, 3403–3406 (2017).
107. Fischer, T. *et al.* Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 4339–4345 (2010).

108. Perl, A. E. Availability of FLT3 inhibitors: how do we use them? *Blood* **134**, 741–745 (2019).
109. Mori, M. *et al.* Gilteritinib, a FLT3/AXL inhibitor, shows antileukemic activity in mouse models of FLT3 mutated acute myeloid leukemia. *Invest. New Drugs* **35**, 556–565 (2017).
110. Gay, C. M., Balaji, K. & Byers, L. A. Giving AXL the axe: targeting AXL in human malignancy. *Br. J. Cancer* **116**, 415–423 (2017).
111. Tarver, T. C. *et al.* Gilteritinib is a clinically active FLT3 inhibitor with broad activity against FLT3 kinase domain mutations. *Blood Adv.* **4**, 514–524 (2020).
112. Auclair, D. *et al.* Antitumor activity of sorafenib in FLT3-driven leukemic cells. *Leukemia* **21**, 439–445 (2007).
113. Prieto-Domínguez, N. *et al.* Modulation of Autophagy by Sorafenib: Effects on Treatment Response. *Front. Pharmacol.* **7**, 151 (2016).
114. Röllig, C. *et al.* Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* **16**, 1691–1699 (2015).
115. Uy, G. L. *et al.* A phase 2 study incorporating sorafenib into the chemotherapy for older adults with FLT3-mutated acute myeloid leukemia: CALGB 11001. *Blood Adv.* **1**, 331–340 (2017).
116. Kampa-Schittenhelm, K. M. *et al.* Quizartinib (AC220) is a potent second generation class III tyrosine kinase inhibitor that displays a distinct inhibition profile against mutant-FLT3, -PDGFRA and -KIT isoforms. *Mol. Cancer* **12**, 19 (2013).
117. Daver, N., Schlenk, R. F., Russell, N. H. & Levis, M. J. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia* **33**, 299–312 (2019).
118. Cortes, J. E. *et al.* Phase 2b study of 2 dosing regimens of quizartinib monotherapy in FLT3-ITD-mutated, relapsed or refractory AML. *Blood* **132**, 598–607 (2018).
119. Tasian, S. K., Pollard, J. A. & Aplenc, R. Molecular therapeutic approaches for pediatric acute myeloid leukemia. *Front. Oncol.* **4**, 55 (2014).
120. Cheng, Y. & Tian, H. Current Development Status of MEK Inhibitors. *Mol. Basel Switz.* **22**, (2017).
121. Jasim, S., Ozsari, L. & Habra, M. A. Multikinase inhibitors use in differentiated thyroid carcinoma. *Biol. Targets Ther.* **8**, 281–291 (2014).
122. Liu, F., Yang, X., Geng, M. & Huang, M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **8**, 552–562 (2018).

123. Borthakur, G. *et al.* Activity of the oral mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor trametinib in RAS-mutant relapsed or refractory myeloid malignancies. *Cancer* **122**, 1871–1879 (2016).
124. Ma, J. *et al.* Inhibition of Bcl-2 Synergistically Enhances the Antileukemic Activity of Midostaurin and Gilteritinib in Preclinical Models of FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **25**, 6815–6826 (2019).
125. Daver, N. *et al.* New directions for emerging therapies in acute myeloid leukemia: the next chapter. *Blood Cancer J.* **10**, 107 (2020).
126. Song, G. *et al.* Synergistic cytotoxicity of sorafenib with busulfan and nucleoside analogs in human FMS-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplications-positive acute myeloid leukemia cells. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **20**, 1687–1695 (2014).
127. Ball, D. W. *et al.* Trametinib with and without pazopanib has potent preclinical activity in thyroid cancer. *Oncol. Rep.* **34**, 2319–2324 (2015).
128. Bridgeman, V. L. *et al.* Preclinical Evidence That Trametinib Enhances the Response to Antiangiogenic Tyrosine Kinase Inhibitors in Renal Cell Carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 172–183 (2016).
129. Zhai, B. & Sun, X.-Y. Mechanisms of resistance to sorafenib and the corresponding strategies in hepatocellular carcinoma. *World J. Hepatol.* **5**, 345–352 (2013).
130. Zauli, G. *et al.* The sorafenib plus nutlin-3 combination promotes synergistic cytotoxicity in acute myeloid leukemic cells irrespectively of FLT3 and p53 status. *Haematologica* **97**, 1722–1730 (2012).
131. Yang, X., Sexauer, A. & Levis, M. Bone marrow stroma-mediated resistance to FLT3 inhibitors in FLT3-ITD AML is mediated by persistent activation of extracellular regulated kinase. *Br. J. Haematol.* **164**, 61–72 (2014).
132. Zhang, W. *et al.* The Dual MEK/FLT3 Inhibitor E6201 Exerts Cytotoxic Activity against Acute Myeloid Leukemia Cells Harboring Resistance-Confering FLT3 Mutations. *Cancer Res.* **76**, 1528–1537 (2016).
133. Long, L. *et al.* Genetic biomarkers of drug resistance: A compass of prognosis and targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **52**, 100703 (2020).
134. Eguchi, M., Minami, Y., Kuzume, A. & Chi, S. Mechanisms Underlying Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Biomedicines* **8**, (2020).
135. Lam, S. S. Y. & Leung, A. Y. H. Overcoming Resistance to FLT3 Inhibitors in the Treatment of FLT3-Mutated AML. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).

136. Trombetti, S. *et al.* Oxidative Stress and ROS-Mediated Signaling in Leukemia: Novel Promising Perspectives to Eradicate Chemoresistant Cells in Myeloid Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
137. van Gils, N., Denkers, F. & Smit, L. Escape From Treatment; the Different Faces of Leukemic Stem Cells and Therapy Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Front. Oncol.* **11**, 659253 (2021).
138. Gurnari, C., Pagliuca, S. & Visconte, V. Deciphering the Therapeutic Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
139. Dlamini, Z., Shoba, B. & Hull, R. Splicing machinery genomics events in acute myeloid leukaemia (AML): in search for therapeutic targets, diagnostic and prognostic biomarkers. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 2690–2704 (2020).
140. Zhang, Y. *et al.* Sp1 and c-Myc modulate drug resistance of leukemia stem cells by regulating survivin expression through the ERK-MSK MAPK signaling pathway. *Mol. Cancer* **14**, 56 (2015).
141. Cucchi, D. G. J., Groen, R. W. J., Janssen, J. J. W. M. & Cloos, J. Ex vivo cultures and drug testing of primary acute myeloid leukemia samples: Current techniques and implications for experimental design and outcome. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **53**, 100730 (2020).
142. Ignatz-Hoover, J. J. *et al.* Aberrant GSK3 $\beta$  nuclear localization promotes AML growth and drug resistance. *Blood Adv.* **2**, 2890–2903 (2018).
143. Rucker, F. G. *et al.* TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood* **119**, 2114–2121 (2012).
144. Damdinsuren, A. *et al.* FLT3-ITD drives Ara-C resistance in leukemic cells via the induction of RUNX3. *Leuk. Res.* **39**, 1405–1413 (2015).
145. McNeer, N. A. *et al.* Genetic mechanisms of primary chemotherapy resistance in pediatric acute myeloid leukemia. *Leukemia* **33**, 1934–1943 (2019).
146. Jiang, W. *et al.* Long non-coding RNAs as a determinant of cancer drug resistance: Towards the overcoming of chemoresistance via modulation of lncRNAs. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **50**, 100683 (2020).
147. Hu, N., Chen, L., Wang, C. & Zhao, H. MALAT1 knockdown inhibits proliferation and enhances cytarabine chemosensitivity by upregulating miR-96 in acute myeloid leukemia cells. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **112**, 108720 (2019).

148. Veuger, M. J. T., Heemskerk, M. H. M., Honders, M. W., Willemze, R. & Barge, R. M. Y. Functional role of alternatively spliced deoxycytidine kinase in sensitivity to cytarabine of acute myeloid leukemic cells. *Blood* **99**, 1373–1380 (2002).
149. Rathe, S. K. *et al.* Using RNA-seq and targeted nucleases to identify mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *Sci. Rep.* **4**, 6048 (2014).
150. Megías-Vericat, J. E. *et al.* Influence of cytarabine metabolic pathway polymorphisms in acute myeloid leukemia induction treatment. *Leuk. Lymphoma* **58**, 2880–2894 (2017).
151. Er, T.-K. *et al.* Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia. *Clin. Biochem.* **40**, 1015–1019 (2007).
152. Farge, T. *et al.* Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov.* **7**, 716–735 (2017).
153. Hosseini, M. *et al.* Targeting Myeloperoxidase Disrupts Mitochondrial Redox Balance and Overcomes Cytarabine Resistance in Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res.* **79**, 5191–5203 (2019).
154. Aroua, N. *et al.* Extracellular ATP and CD39 Activate cAMP-Mediated Mitochondrial Stress Response to Promote Cytarabine Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov.* **10**, 1544–1565 (2020).
155. Wang, A. & Zhong, H. Roles of the bone marrow niche in hematopoiesis, leukemogenesis, and chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. *Hematol. Amst. Neth.* **23**, 729–739 (2018).
156. Dias, S., Choy, M., Alitalo, K. & Rafii, S. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood* **99**, 2179–2184 (2002).
157. Sheng, Y. *et al.* FOXM1 regulates leukemia stem cell quiescence and survival in MLL-rearranged AML. *Nat. Commun.* **11**, 928 (2020).
158. Krakowsky, R. H. E. *et al.* miR-451a abrogates treatment resistance in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* **8**, (2018).
159. Jiao, Q. *et al.* Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol. Cancer* **17**, (2018).
160. Grunwald, M. R. & Levis, M. J. FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: a review of their efficacy and mechanisms of resistance. *Int. J. Hematol.* **97**, 683–694 (2013).
161. Metzelder, S. *et al.* Compassionate use of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: sustained regression before and after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **113**, 6567–6571 (2009).

162. Zimmerman, E. I. *et al.* Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Blood* **122**, 3607–3615 (2013).
163. Bruner, J. K. *et al.* Adaptation to TKI Treatment Reactivates ERK Signaling in Tyrosine Kinase–Driven Leukemias and Other Malignancies. *Cancer Res.* **77**, 5554–5563 (2017).
164. Marensi, V., Keeshan, K. R. & MacEwan, D. J. Pharmacological impact of FLT3 mutations on receptor activity and responsiveness to tyrosine kinase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **183**, 114348 (2021).
165. Smith, C. C. *et al.* Emerging Mutations at Relapse in Patients with FLT3-Mutated Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia Who Received Gilteritinib Therapy in the Phase 3 Admiral Trial. *Blood* vol. 134 14–14 (2019).
166. Smith, C. C. *et al.* A phase 1/2 study of the oral FLT3 inhibitor pexidartinib in relapsed/refractory FLT3-ITD-mutant acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* **4**, 1711–1721 (2020).
167. McMahan, C. M. *et al.* Clonal Selection with RAS Pathway Activation Mediates Secondary Clinical Resistance to Selective FLT3 Inhibition in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov.* **9**, 1050–1063 (2019).
168. Rummelt, C. *et al.* Activating JAK-mutations confer resistance to FLT3 kinase inhibitors in FLT3-ITD positive AML in vitro and in vivo. *Leukemia* **35**, 2017–2029 (2021).
169. Weisberg, E. *et al.* Selective Akt inhibitors synergize with tyrosine kinase inhibitors and effectively override stroma-associated cytoprotection of mutant FLT3-positive AML cells. *PLoS One* **8**, e56473 (2013).
170. Weisberg, E. *et al.* Reversible resistance induced by FLT3 inhibition: a novel resistance mechanism in mutant FLT3-expressing cells. *PLoS One* **6**, e25351 (2011).
171. Weisberg, E. *et al.* Using combination therapy to override stromal-mediated chemoresistance in mutant FLT3-positive AML: synergism between FLT3 inhibitors, dasatinib/multi-targeted inhibitors and JAK inhibitors. *Leukemia* **26**, 2233–2244 (2012).
172. Scholl, S., Fleischmann, M., Schnetzke, U. & Heidel, F. H. Molecular Mechanisms of Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Ongoing Challenges and Future Treatments. *Cells* **9**, (2020).
173. Chen, F., Ishikawa, Y., Akashi, A., Naoe, T. & Kiyoi, H. Co-expression of wild-type FLT3 attenuates the inhibitory effect of FLT3 inhibitor on FLT3 mutated leukemia cells. *Oncotarget* **7**, 47018–47032 (2016).

174. Okada, K. *et al.* FLT3-ITD induces expression of Pim kinases through STAT5 to confer resistance to the PI3K/Akt pathway inhibitors on leukemic cells by enhancing the mTORC1/Mcl-1 pathway. *Oncotarget* **9**, 8870–8886 (2018).
175. Nelson, E. A. *et al.* The STAT5 Inhibitor Pimozide Displays Efficacy in Models of Acute Myelogenous Leukemia Driven by FLT3 Mutations. *Genes Cancer* **3**, 503–511 (2012).
176. Green, A. S. *et al.* Pim kinases modulate resistance to FLT3 tyrosine kinase inhibitors in FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Sci. Adv.* **1**, e1500221 (2015).
177. Dumas, P.-Y. *et al.* Hematopoietic niche drives FLT3-ITD acute myeloid leukemia resistance to quizartinib via STAT5-and hypoxia-dependent upregulation of AXL. *Haematologica* **104**, 2017–2027 (2019).
178. Chang, Y.-T. *et al.* Role of CYP3A4 in bone marrow microenvironment-mediated protection of FLT3/ITD AML from tyrosine kinase inhibitors. *Blood Adv.* **3**, 908–916 (2019).
179. Traer, E. *et al.* FGF2 from Marrow Microenvironment Promotes Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res.* **76**, 6471–6482 (2016).
180. Schimmer, A. D. Novel Mitochondrial Mechanisms of Cytarabine Resistance in Primary AML Cells. *Cancer Discov.* **7**, 670–672 (2017).
181. Tang, Z. *et al.* GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* **45**, W98–W102 (2017).
182. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* **45**, 580–585 (2013).
183. Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* **6**, p11 (2013).
184. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408 (2001).
185. Anders, S., Reyes, A. & Huber, W. Detecting differential usage of exons from RNA-seq data. *Genome Res.* **22**, 2008–2017 (2012).
186. Chen, S. *et al.* Silencing of long noncoding RNA SRRM2-AS exerts suppressive effects on angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma via activating MYLK-mediated cGMP-PKG signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* **235**, 7757–7768 (2020).
187. Zhou, X. *et al.* BCLAF1 and its splicing regulator SRSF10 regulate the tumorigenic potential of colon cancer cells. *Nat. Commun.* **5**, 4581 (2014).
188. Whisenant, T. C. *et al.* The Activation-Induced Assembly of an RNA/Protein Interactome Centered on the Splicing Factor U2AF2 Regulates Gene Expression in Human CD4 T Cells. *PLoS One* **10**, e0144409 (2015).

189. Miyagawa, R. *et al.* Identification of cis- and trans-acting factors involved in the localization of MALAT-1 noncoding RNA to nuclear speckles. *RNA N. Y. N* **18**, 738–751 (2012).
190. Bradley, T., Cook, M. E. & Blanchette, M. SR proteins control a complex network of RNA-processing events. *RNA N. Y. N* **21**, 75–92 (2015).
191. Hernández, F. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **279**, 3801–3806 (2004).
192. Chou, T. C. & Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* **22**, 27–55 (1984).
193. Casado, P. *et al.* Proteomic and genomic integration identifies kinase and differentiation determinants of kinase inhibitor sensitivity in leukemia cells. *Leukemia* **32**, 1818–1822 (2018).
194. van Alphen, C. *et al.* Phosphotyrosine-based Phosphoproteomics for Target Identification and Drug Response Prediction in AML Cell Lines. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **19**, 884–899 (2020).
195. Patel, C. *et al.* Multidrug resistance in relapsed acute myeloid leukemia: evidence of biological heterogeneity. *Cancer* **119**, 3076–3083 (2013).
196. Onecha, E. *et al.* Improving the prediction of acute myeloid leukaemia outcomes by complementing mutational profiling with ex vivo chemosensitivity. *Br. J. Haematol.* **189**, 672–683 (2020).
197. van Dijk, A. D., de Bont, E. S. J. M. & Kornblau, S. M. Targeted therapy in acute myeloid leukemia: current status and new insights from a proteomic perspective. *Expert Rev. Proteomics* **17**, 1–10 (2020).
198. Casado, P. *et al.* Kinase-substrate enrichment analysis provides insights into the heterogeneity of signaling pathway activation in leukemia cells. *Sci. Signal.* **6**, rs6 (2013).
199. Schaab, C. *et al.* Global phosphoproteome analysis of human bone marrow reveals predictive phosphorylation markers for the treatment of acute myeloid leukemia with quizartinib. *Leukemia* **28**, 716–719 (2014).
200. Murray, H. C. *et al.* Quantitative phosphoproteomics uncovers synergy between DNA-PK and FLT3 inhibitors in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* **35**, 1782–1787 (2021).
201. Aasebø, E. *et al.* Proteome and Phosphoproteome Changes Associated with Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers* **12**, (2020).

202. Nguyen, N. H. K. *et al.* Global Proteomic Profiling of Pediatric AML: A Pilot Study. *Cancers* **13**, (2021).
203. Sinha, R. *et al.* Arginine methylation controls the subcellular localization and functions of the oncoprotein splicing factor SF2/ASF. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 2762–2774 (2010).
204. Löwenberg, B. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 26–28 (2013).
205. Mavrou, A. & Oltean, S. SRPK1 inhibition in prostate cancer: A novel anti-angiogenic treatment through modulation of VEGF alternative splicing. *Pharmacol. Res.* **107**, 276–281 (2016).
206. Gammons, M. V. *et al.* Targeting SRPK1 to control VEGF-mediated tumour angiogenesis in metastatic melanoma. *Br. J. Cancer* **111**, 477–485 (2014).
207. Vazquez, R. *et al.* Venetoclax combination therapy induces deep AML remission with eradication of leukemic stem cells and remodeling of clonal haematopoiesis. *Blood Cancer J.* **11**, 62 (2021).
208. Chou, T.-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* **70**, 440–446 (2010).
209. Pessina, A. *et al.* Application of the CFU-GM assay to predict acute drug-induced neutropenia: an international blind trial to validate a prediction model for the maximum tolerated dose (MTD) of myelosuppressive xenobiotics. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **75**, 355–367 (2003).
210. Ustun, C., DeRemer, D. L., Jillella, A. P. & Bhalla, K. N. Investigational drugs targeting FLT3 for leukemia. *Expert Opin. Investig. Drugs* **18**, 1445–1456 (2009).
211. Fischer, M. *et al.* Impact of FLT3-ITD diversity on response to induction chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* **102**, e129–e131 (2017).
212. Kayser, S. *et al.* Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood* **114**, 2386–2392 (2009).
213. Stone, R. M. *et al.* Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N. Engl. J. Med.* **377**, 454–464 (2017).
214. Mody, R. J. *et al.* Integrative Clinical Sequencing in the Management of Refractory or Relapsed Cancer in Youth. *JAMA* **314**, 913–925 (2015).
215. Parkin, B. *et al.* Clonal evolution and devolution after chemotherapy in adult acute myelogenous leukemia. *Blood* **121**, 369–377 (2013).
216. Hou, P. *et al.* A Genome-Wide CRISPR Screen Identifies Genes Critical for Resistance to FLT3 Inhibitor AC220. *Cancer Res.* **77**, 4402–4413 (2017).

217. Caunt, C. J. & McArdle, C. A. ERK phosphorylation and nuclear accumulation: insights from single-cell imaging. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 224–229 (2012).
218. Yokoyama, N. *et al.* Activation of ERK1/2 Causes Pazopanib Resistance via Downregulation of DUSP6 in Synovial Sarcoma Cells. *Sci. Rep.* **7**, 45332 (2017).
219. Nishioka, C. *et al.* Blockade of MEK/ERK signaling enhances sunitinib-induced growth inhibition and apoptosis of leukemia cells possessing activating mutations of the FLT3 gene. *Leuk. Res.* **32**, 865–872 (2008).
220. Kim, Y. *et al.* Quantitative fragment analysis of FLT3-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length. *Blood Cancer J.* **5**, e336–e336 (2015).
221. Wang, E. *et al.* Phase I study of trametinib combined with sorafenib in patients (pts) with advanced hepatocellular cancer (HCC). *J. Clin. Oncol.* **37**, 431–431 (2019).
222. Serve, H. *et al.* Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 3110–3118 (2013).
223. Chen, S.-W. *et al.* Phase 2 study of combined sorafenib and radiation therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **88**, 1041–1047 (2014).
224. Braess, J. Akute myeloische Leukämie. *DMW - Dtsch. Med. Wochenschr.* **141**, 1748–1751 (2016).
225. Piloto, O. *et al.* Prolonged exposure to FLT3 inhibitors leads to resistance via activation of parallel signaling pathways. *Blood* **109**, 1643–1652 (2007).
226. Hart, S. *et al.* Pacritinib (SB1518), a JAK2/FLT3 inhibitor for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* **1**, e44 (2011).
227. Zeng, Z. *et al.* High-throughput profiling of signaling networks identifies mechanism-based combination therapy to eliminate microenvironmental resistance in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **102**, 1537–1548 (2017).
228. Bardet, V. *et al.* Single cell analysis of phosphoinositide 3-kinase/Akt and ERK activation in acute myeloid leukemia by flow cytometry. *Haematologica* **91**, 757–764 (2006).
229. Robert, C. *et al.* Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N. Engl. J. Med.* **372**, 30–39 (2015).
230. Dahlberg, A., Delaney, C. & Bernstein, I. D. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **117**, 6083–6090 (2011).
231. Somasagara, R. R. *et al.* Targeted therapy of human leukemia xenografts in immunodeficient zebrafish. *Sci. Rep.* **11**, 5715 (2021).

232. Bertoli, S. *et al.* Time from diagnosis to intensive chemotherapy initiation does not adversely impact the outcome of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 2618–2626 (2013).
233. Estey, E. H. Acute myeloid leukemia: 2021 update on risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* **95**, 1368–1398 (2020).
234. Hyrenius-Wittsten, A. *et al.* Genomic profiling and directed ex vivo drug analysis of an unclassifiable myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm progressing into acute myeloid leukemia. *Genes. Chromosomes Cancer* **55**, 847–854 (2016).
235. Chyla, B. *et al.* Genetic Biomarkers Of Sensitivity and Resistance to Venetoclax Monotherapy in Patients With Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Am. J. Hematol.* **93**, E202-205 (2018).
236. Degirmenci, U., Wang, M. & Hu, J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells* **9**, (2020).
237. Han, L. *et al.* Concomitant targeting of BCL2 with venetoclax and MAPK signaling with cobimetinib in acute myeloid leukemia models. *Haematologica* **105**, 697–707 (2020).



## 8. ANEXOS



**Anexo 1. Listado de ensayos clínicos mencionados en el texto.**

Se detalla el identificador (NCT), título y enlace de cada ensayo clínico que se ha mencionado en el texto.

**NCT03614728.** *Study to Investigate the Safety and Clinical Activity of GSK3326595 and Other Agents to Treat Myelodysplastic Syndrome (MDS) and Acute Myeloid Leukemia (AML).*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03614728>

**NCT03666988.** *First Time in Humans (FTIH) Study of GSK3368715 in Participants With Solid Tumors and Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL).*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03666988>

**NCT02783300.** *An Open-label, Dose Escalation Study to Investigate the Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Clinical Activity of GSK3326595 in Participants With Solid Tumors and Non-Hodgkin's Lymphoma (Meteor 1).*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02783300>

**NCT03854227.** *A Dose Escalation Study Of PF-06939999 In Participants With Advanced Or Metastatic Solid Tumors.*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03854227>

**NCT02841540.** *A Study of H3B-8800 in Participants With Myelodysplastic Syndromes, Acute Myeloid Leukemia, and Chronic Myelomonocytic Leukemia.*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02841540>

**NCT03512197.** *A Global Study of the Efficacy and Safety of Midostaurin + Chemotherapy in Newly Diagnosed Patients With FLT3 Mutation Negative (FLT3-MN) Acute Myeloid Leukemia (AML).*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03512197>

**NCT02421939.** *A Study of ASP2215 Versus Salvage Chemotherapy in Patients With Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML) With FMS-like Tyrosine Kinase (FLT3) Mutation.*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02421939>

**NCT04107727.** *Trial to Compare Efficacy and Safety of Chemotherapy/Quizartinib vs Chemotherapy/Placebo in Adults FMS-like Tyrosine Kinase 3 (FLT3) Wild-type Acute Myeloid Leukemia (AML).*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04107727>

**NCT00920140.** *Open-label Study to Evaluate the Safety, PK, and PD of MEK Inhibitor GSK1120212 in Subjects With Relapsed or Refractory Leukemias.*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00920140>

**NCT04140487.** *Azacitidine, Venetoclax, and Gilteritinib in Treating Patients With Recurrent/Refractory FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia, Chronic Myelomonocytic Leukemia, or High-Risk Myelodysplastic Syndrome/Myeloproliferative Neoplasm.*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04140487>

**NCT04266795.** *Triple Combination of Pevonedistat and Venetoclax Plus Azacitidine in Adults With Acute Myeloid Leukemia Who Are Unfit for Intensive Chemotherapy (PEVENAZA).*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04266795>

**NCT00840346.** *Panobinostat in Combination With Idarubicin and Cytarabine in Patients Aged 65 Years or Older With Newly Diagnosed Acute Myeloblastic Leukaemia (AML) (PANOBIDARA).*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00840346>

**NCT00651261.** *Daunorubicin, Cytarabine, and Midostaurin in Treating Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia.*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00651261>

**NCT02292173.** *Trametinib in Combination With Sorafenib in Patients With Advanced Hepatocellular Cancer.*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02292173>

**NCT00045942.** *PKC412 in Participants With Acute Myeloid Leukemia or With Myelodysplastic Syndrome (CPKC412A2104 Core); and PKC412 in Participants With Acute Myeloid Leukemia or With Myelodysplastic Syndrome With Either Wild Type or Mutated FMS-like Tyrosine Kinase 3 (FLT3) (CPKC412A2104E1 and CPKC412A2104E2).*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00045942>

**NCT02418000.** *A Study of E6201 for the Treatment of Advanced Hematologic Malignancies With FLT3 and/or Ras Mutations.*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02418000>

**NCT03735875.** *Venetoclax and Quizartinib in Treating Patients With FLT3-mutated Recurrent or Refractory Acute Myeloid Leukemia.*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03735875>

**NCT03625505.** *A Study to Assess Safety and Efficacy of Venetoclax in Combination With Gilteritinib in Participants With Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia.*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03625505>

**NCT03661307.** *Quizartinib, Decitabine, and Venetoclax in Treating Participants With Untreated or Relapsed Acute Myeloid Leukemia or High Risk Myelodysplastic Syndrome.*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03661307>

**NCT02670044.** *A Study of Venetoclax in Combination With Cobimetinib and Venetoclax in Combination With Idasanutlin in Patients With Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia Who Are Not Eligible for Cytotoxic Therapy.*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02670044>

**NCT04487106.** *Azacitidine, Venetoclax, and Trametinib for the Treatment of Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia or Higher-Risk Myelodysplastic Syndrome.*

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04487106>





ID	G	E	F	MUTACIONES	TTO			MOM	TIPO	%	TÉCNICA													
					C	R	T				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
44	M	49	6	MPL, SETBP1	X	R		DG	MO-MET	83						X								
45	M	73	5		X	R		DG	MO-MET	63						X								
46	M	63	5	FLT3, IDH2, NPM1	X	R	X	DG	MO-MET	59						X								
47	F	63	1	KIT, RUNX1	X	R		DG	MO-MET	30						X								
48	F	64	t	JAK2, KIT, NPM1, NRAS	X	R	X	DG	MO-MET	30						X								
49	F	62	5	KMT2A	X	R		DG	MO-MET	93						X								
50	M	74	2	CEBPA, RUNX1, SRSF2, STAG2, TET2	X	R		DG	MO-MET	34						X								
51	M	50	4	FLT3, IDH2, NRAS, WT1	X	R		DG	MO-MET	65						X								
52	F	48	t	EPAS1, FLT3, NRAS, RUNX1	X	R		DG	MO-MET	28						X								
53	F	55	2	FLT3-ITD	X	R		DG	MO-MET	71						X								
54	M	44	1	ETV6, RUNX1	X	R		DG	MO-MET	86						X								
55	M	66	4	IDH2, NPM1	X	R		DG	MO-MET	28						X								
56	F	71	5	DNMT3A, FLT3, NPM1, SMC1A	X	R	X	DG	MO-MET	84						X								
57	F	44	5	CBL, NRAS	X	R		DG	MO-MET	80						X								
58	M	76	2	NR	X	NR		DG	MO-MET	41						X								
59	M	76	2	IDH1, JAK2, KIT, TP53	X	NR		DG	MO-MET	59						X								
60	M	67	s		X	NR		DG	MO-MET	27						X								
61	M	77	1	CBL, FLT3-ITD, SF3A1	X	NR		DG	MO-MET	86						X								
62	M	47	t	TP53	X	NR		DG	MO-ARN MO-MET	26						X	X							
63	M	51	2	RUNX1, TP53	X	NR		DG	MO-ARN MO-MET	21						X	X							
64	M	81	t	NRAS	X	NR		DG	MO-MET	21						X								
65	M	65	s		X	NR		DG	MO-ARN MO-MET	81						X	X							
66	M	59	s	RAD21, SF3B1, TET2	X	NR		DG	MO-MET	20						X								
67	F	56	2	BCORL1, DNMT3A, FLT3, NRAS, RUNX1	X	NR		DG	MO-MET	53						X								
68	M	58	1	DNMT3A, IDH2, NPM1, RAD21	X	NR		DG	BMMC MO-MET	79						X		X						
69	M	59	1	BCORL1, CALR, NPM1, TET2	X	NR		DG	MO-MET	88						X								
70	M	56	2	TP53	X	NR		DG	MO-MET	40						X								

ID	G	E	F	MUTACIONES	TTO			MOM	TIPO	%	TÉCNICA																			
					C	R/C	T				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12								
71	M	73	5	NR	X			DG	MO-ARN	91								X												
72	F	63	5	ASXL1, SF3B1	X			DG	MO-ARN	55								X												
73	M	4	5	NR	X			DG	MO-ARN	34								X												
74	M	48	2	DNMT3A, IDH2, KRAS, NRAS, TET2	X			DG	MO-ARN	56								X												
75	F	1	5	FLT3-ITD, NPM1, NRAS	X			DG	MO-ARN	74								X												
76	M	71	1	FLT3-L576P	X		X	D5	PBMC	67											X									
								D15	PBMC	40															X					
								D188	PBMC	81																	X			
								D191	PBMC	81																		X		
								D195	PBMC	81																			X	
77	M	76	1		X			REC	BMMC	40														X						
78	M	75	1	CEBPA	X			DG	BMMC	90														X						

**Tabla 12. Listado de pacientes con LMA.** Se detallan las características principales de los pacientes con LMA cuyas muestras se han empleado. **ID (identificador del paciente):** 1 – 78; **G (género):** F, femenino; M, masculino; **ED (edad del paciente al diagnóstico); F (clasificación de la LMA):** 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 (subtipos de la clasificación de la FAB), s, LMA secundaria a enfermedades mielodisplásicas, t, LMA secundaria relacionada con la terapia; **MUTACIONES (mutaciones detectadas al diagnóstico):** NR, panel de secuenciación no realizado; **TTO (tratamiento): C** (tratamiento con citarabina); **R/C** (respuesta a citarabina, sólo indicado para las muestras empleadas en la técnica 6): R, respondedor; NR, no respondedor; **T** (tratamiento con TKI); **MOM (momento de la muestra):** DG, diagnóstico; REC, recaída; REF, refractariedad; D5, D15, D188, D191, D195, días 5, 15, 188, 191 o 195 de tratamiento; **TIPO (tipo de muestra):** MO-ARN, ARN de médula ósea; MO-P, coágulo de médula ósea embebido en parafina; MO-MET, extensión de médula ósea fijada en metanol; BMMC, células mononucleadas de médula ósea; PBMC, células mononucleadas de sangre periférica; **% (porcentaje de blastos); TÉCNICA (técnica para la que se han empleado las muestras del paciente):** 1, expresión de *SRRM2* y *SRSF12* por PCRq; 2, expresión de *SRRM2* pareada (diagnóstico vs resistencia) por PCRq; 3, estudios de resistencia a citarabina mediante fosfo-proteómica; 4, inmunohistoquímica pareada (diagnóstico vs recaída) para las proteínas SR fosforiladas y sin fosforilar; 5, inmunohistoquímica pareada (diagnóstico vs refractariedad) para las proteínas SR fosforiladas; 6, inmunohistoquímica al diagnóstico de pacientes respondedores y no respondedores para las proteínas SR fosforiladas; 7, secuenciación del ARN; 8, experimentos *ex vivo* de dosis-respuesta a fármacos con H3B-8800, venetoclax y su combinación; 9, estudios de resistencia a TKI mediante fosfo-proteómica; 10, estudios de electrotransferencia para ERK1/2 y fosfo-ERK1/2; 11, inmunohistoquímica pareada (diagnóstico vs resistencia) para la proteína fosfo-ERK1/2; 12, experimentos *ex vivo* de dosis-respuesta a fármacos con midostaurina, trametinib y su combinación.

CONDICIÓN	ID	G	EDAD	TIPO	TÉCNICA			
					1.1	1.2	13	14
NMP	N1	M	75	MO-ARN	X	X		
	N2	M	53	MO-ARN	X	X		
	N3	M	58	MO-ARN	X	X		
	N4	M	79	MO-ARN	X	X		
	N5	F	83	MO-ARN	X	X		
	N6	F	74	MO-ARN	X	X		
	N7	F	44	MO-ARN	X	X		
	N8	M	88	MO-ARN	X	X		
	N9	M	75	MO-ARN	X	X		
	N10	F	81	MO-ARN	X	X		
	N11	M	87	MO-ARN	X	X		
	N12	M	73	MO-ARN	X			
SMD	S1	M	64	MO-ARN	X	X		
	S2	M	82	MO-ARN	X	X		
	S3	M	59	MO-ARN	X	X		
	S4	M	66	MO-ARN	X	X		
	S5	M	73	MO-ARN	X	X		
	S6	M	78	MO-ARN	X	X		
	S7	F	42	MO-ARN	X	X		
	S8	F	79	MO-ARN	X	X		
	S9	M	80	MO-ARN	X	X		
	S10	F	84	MO-ARN	X	X		
	S11	M	88	MO-ARN	X	X		
DONANTE	D1	F	68	MO-ARN	X	X		
	D2	M	59	MO-ARN	X	X		
	D3	M	68	MO-ARN	X	X		
	D4	F	59	MO-ARN	X	X		
	D5	M	82	MO-ARN	X	X		
	D6	M	33	MO-ARN	X	X		
	D7	F	54	MO-ARN	X	X		
	D8	F	55	MO-ARN	X	X		
	D9	M	36	MO-ARN	X	X		
	D10	F	80	MO-ARN	X	X		
	D11	M	52	MO-ARN	X	X		
	D12	F	72	MO-ARN	X	X		
	D13	F	28	MO-ARN	X	X		
	D14	M	46	MO-ARN	X	X		
	D15	M	39	MO-ARN	X			
	D16	M	50	BMMC - CD34+			X	
	D17	F	65	BMMC - CD34+			X	
	D18	F	64	BMMC - CD34+			X	
	D19	F	48	BMMC - CD34+				X
	D20	F	61	BMMC - CD34+				X
	D21	M	38	BMMC - CD34+				X

**Tabla 13. Listado de pacientes con NMP, SMD y donantes empleados.** Se detallan las características principales de los pacientes con NMP, SMD y donantes cuyas muestras se han empleado para la realización de este trabajo. **EDAD (edad a la toma de muestra); TIPO (tipo de muestra):** MO-ARN, ARN de médula ósea; BMMC – CD34+, células progenitoras mieloides CD34+ provenientes de células mononucleadas de médula ósea; **TÉCNICA (técnica para la que se han empleado las muestras del paciente):** **1.1**, expresión de *SRRM2* por PCRq; **1.2**, expresión de *SRSF12* por PCRq; **13**, experimentos *ex vivo* de toxicidad a fármacos con H3B-8800, venetoclax y su combinación; **14**, experimentos *ex vivo* de toxicidad a fármacos con midostaurina, trametinib y su combinación.

**Anexo 3. Listado de genes codificantes de proteínas SR.**

Los genes englobados en el texto bajo el término “codificantes de las proteínas SR” se obtuvieron a partir de la base de datos *UniProtKB* realizando la búsqueda de las proteínas incluidas en la familia “*Splicing factor SR family*”:

*CLASRP, PNISR, RBM23, RBM39, RNPS1, SCAF1, SREK1, SRRM1, SRRM2, SRSF1, SRSF10, SRSF11, SRSF12, SRSF2, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF6, SRSF7, SRSF8, SRSF9, TRA2A, TRA2B, U2AF1, U2AF1L4, U2AF1L5, U2AF2, U2SURP*

**Anexo 4. Listado de genes contemplados en el panel mieloide de secuenciación por NGS.**

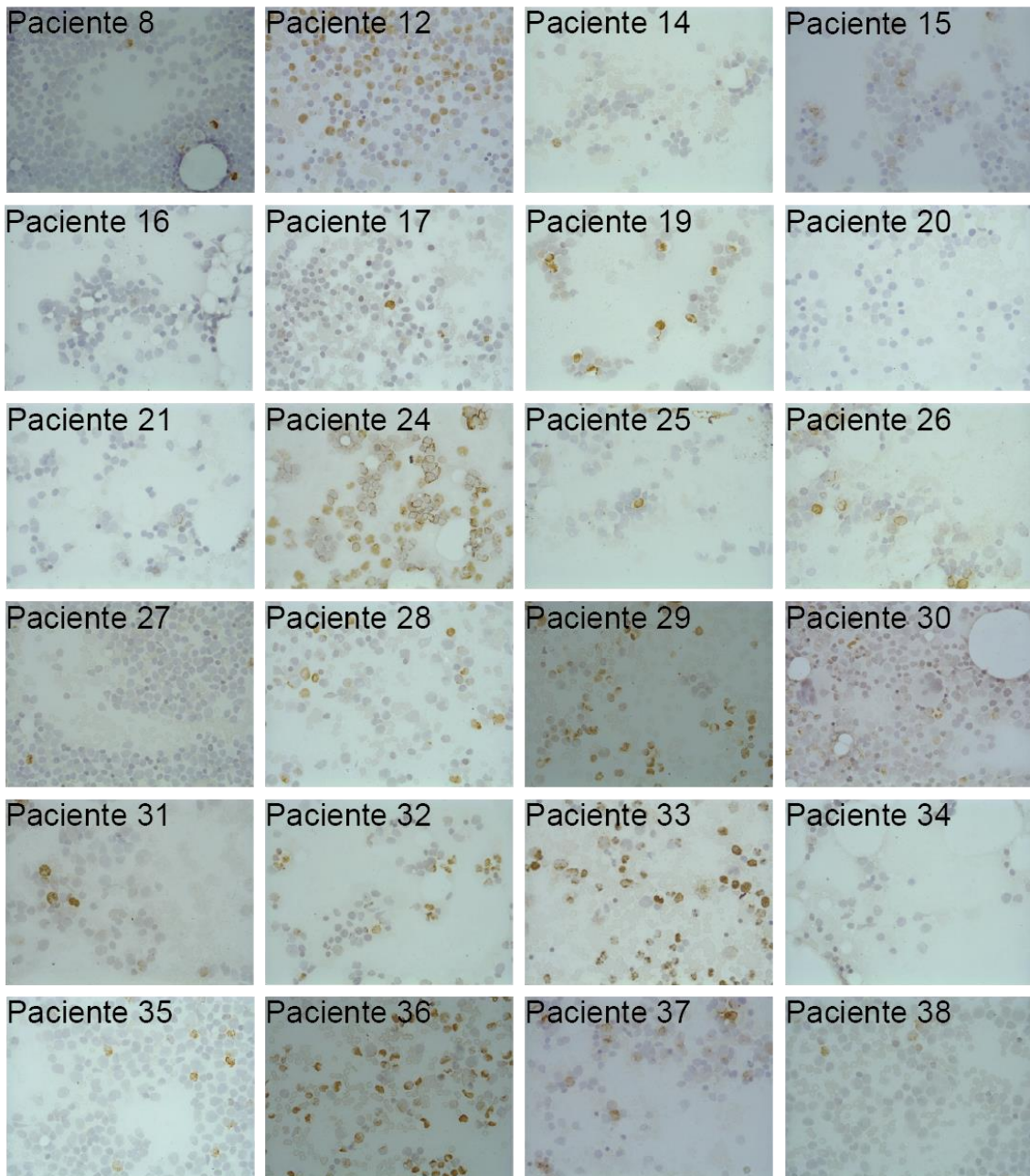
A continuación, se muestra la relación de los 42 genes que se contemplan en el panel mieloide de secuenciación por NGS del Hospital 12 de Octubre:

*ASXL1, BCOR, BCORL1, CALR, CBL, CEBPA, CSF3R, DNMT3A, EPAS1, EPOR, ETV6, EZH2, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KDM6A, KIT, KMT2A, KRAS, MPL, NF1, NPM1, NRAS, PHF6, PRPF40B, RAD21, RUNX1, SETBP1, SF3A1, SF3B1, SH2B3, MC1A, SRSF2, STAG2, TET2, THPO, TP53, U2AF1, VHL, WT1 y ZRSR2.*

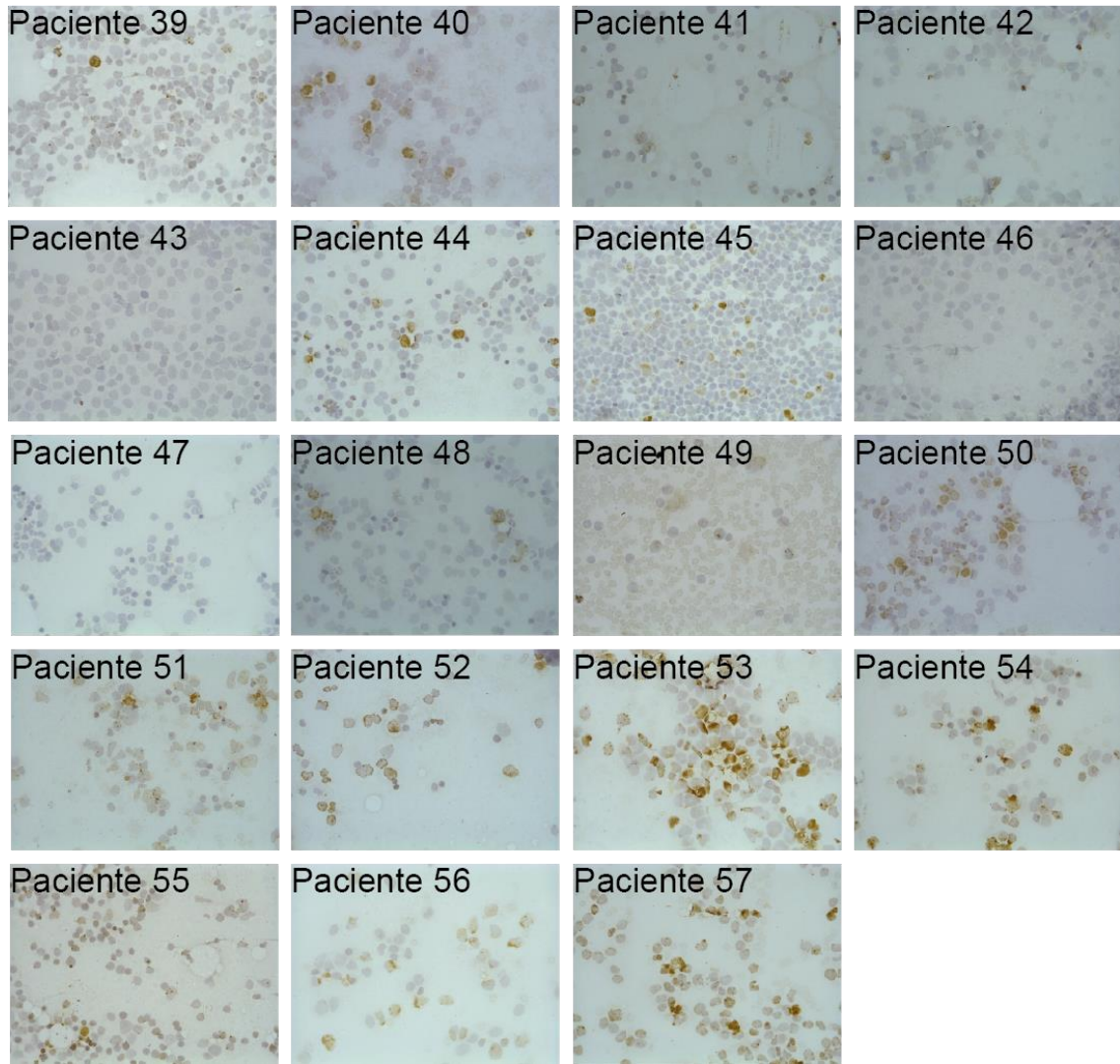
## Anexo 5. Imágenes de los estudios inmunohistoquímicos de las proteínas SR fosforiladas.

Se muestran las imágenes de todas las muestras de médula ósea al diagnóstico de pacientes respondedores (n = 43) y no respondedores (n = 21) al tratamiento con citarabina empleadas para el estudio de las proteínas SR fosforiladas.

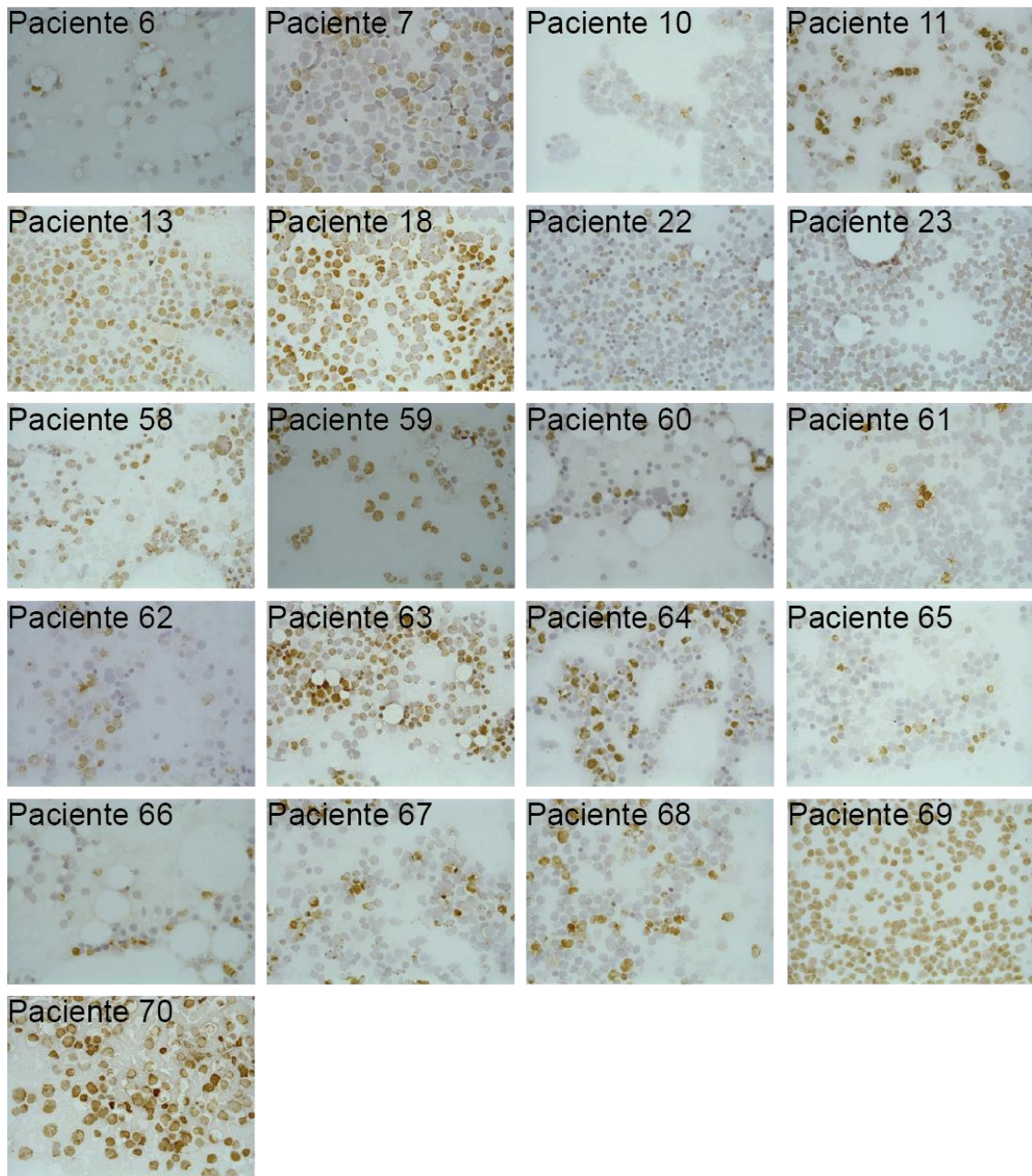
### Respondedores



# Respondedores



# No respondedores



**Anexo 6. Publicaciones derivadas de esta tesis.**

OPEN

# MEK inhibition enhances the response to tyrosine kinase inhibitors in acute myeloid leukemia

María Luz Morales<sup>1</sup>, Alicia Arenas<sup>1</sup>, Alejandra Ortiz-Ruiz<sup>1</sup>, Alejandra Leivas<sup>1</sup>, Inmaculada Rapado<sup>1,2,3</sup>, Alba Rodríguez-García<sup>1</sup>, Nerea Castro<sup>2</sup>, Ivana Zagorac<sup>4</sup>, Miguel Quintela-Fandino<sup>4</sup>, Gonzalo Gómez-López<sup>5</sup>, Miguel Gallardo<sup>1</sup>, Rosa Ayala<sup>1,2,3,6</sup>, María Linares<sup>1,6,7\*</sup> & Joaquín Martínez-López<sup>1,2,3,6,7</sup>

FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) is a key driver of acute myeloid leukemia (AML). Several tyrosine kinase inhibitors (TKIs) targeting FLT3 have been evaluated clinically, but their effects are limited when used in monotherapy due to the emergence of drug-resistance. Thus, a better understanding of drug-resistance pathways could be a good strategy to explore and evaluate new combinational therapies for AML. Here, we used phosphoproteomics to identify differentially-phosphorylated proteins in patients with AML and TKI resistance. We then studied resistance mechanisms *in vitro* and evaluated the efficacy and safety of rational combinational therapy *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* in mice. Proteomic and immunohistochemical studies showed the sustained activation of ERK1/2 in bone marrow samples of patients with AML after developing resistance to FLT3 inhibitors, which was identified as a common resistance pathway. We examined the concomitant inhibition of MEK-ERK1/2 and FLT3 as a strategy to overcome drug-resistance, finding that the MEK inhibitor trametinib remained potent in TKI-resistant cells and exerted strong synergy when combined with the TKI midostaurin in cells with mutated and wild-type FLT3. Importantly, this combination was not toxic to CD34+ cells from healthy donors, but produced survival improvements *in vivo* when compared with single therapy groups. Thus, our data point to trametinib plus midostaurin as a potentially beneficial therapy in patients with AML.

Activating mutations in FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) are present in up to 35% of patients with acute myeloid leukemia (AML). FLT3 is a member of the class III receptor tyrosine kinase family and plays important roles in modulating the proliferation and differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells by activating downstream mitogenic signaling pathways such as Ras/MAPK, JAK/Stat5, and PI3K-Akt<sup>1,2</sup>. Two major classes of activating mutations have been identified in FLT3: internal tandem duplications (ITDs) of 3 to 400 bp within the juxtamembrane domain (JMD), which is the most prevalent form of mutant FLT3<sup>3</sup>; and point mutations in the activation loop<sup>4</sup> of the tyrosine kinase domain (TKD). Less common mutations include activating point mutations in a 16-amino-acid stretch of the FLT3 JMD<sup>3,5,6</sup> or ITDs in the TKD-1<sup>7</sup>. All of these mutations ultimately drive constitutive activation of the FLT3 receptor and activate its downstream oncogenic pathways<sup>5,7,8</sup>.

To date, more than 20 FLT3 inhibitors have been developed, and eight of them have been evaluated in clinical trials<sup>9–11</sup>. For example, the tyrosine kinase inhibitor (TKI) sorafenib, which is currently approved for the treatment of renal cell carcinoma, hepatocellular carcinoma, and radioactive iodine-refractory thyroid cancer, produces a high response rate in FLT3-ITD-positive relapsed/refractory AML<sup>12</sup>. Moreover, a large phase III study demonstrated the efficacy of sorafenib in the upfront setting of young patients with AML, with superior

<sup>1</sup>H120-CNIO Haematological Malignancies Clinical Research Unit, Hospital 12 de Octubre – Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain. <sup>2</sup>Servicio de Hematología, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain. <sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC), ISCIII, Madrid, Spain. <sup>4</sup>Breast Cancer Clinical Research Unit, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain. <sup>5</sup>Bioinformatics Unit, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain. <sup>6</sup>Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. <sup>7</sup>These authors contributed equally: María Linares and Joaquín Martínez-López. \*email: [mlinares@ucm.es](mailto:mlinares@ucm.es)

event-free survival, relapse-free survival, and leukemia-free survival in the sorafenib arm<sup>13</sup>. Another relevant TKI is midostaurin, which inhibits FLT3 and exhibits antiproliferative effects in mutant and wild-type (WT) *FLT3* cells<sup>14</sup>. The initial results of a phase III international study demonstrated a survival benefit in the midostaurin arm<sup>15</sup>. Indeed, midostaurin is the only FLT3 inhibitor approved in combination with intensive chemotherapy for adult patients with AML exhibiting activating *FLT3* mutations<sup>10</sup>.

Despite these encouraging results, all of the TKIs tested so far have failed to show an efficient response in AML when used as a single drug<sup>8,9</sup>, and either did not generate a sufficient initial response, or failed to sustain therapeutic benefits because of secondary resistance<sup>11</sup>. Among the possible mechanisms for these failures is the existence of independent, alternative survival pathways, such as casein kinase 2 alpha, CD47, CD123, PIM, PI3K/AKT/mTORC, JAK/STAT, and MAPK<sup>1,3,16–20</sup>. Accordingly, the characterization of resistance mechanisms is important for the design of new drugs targeting downstream or parallel FLT3 pathways<sup>2,9</sup>.

Resistance to TKIs *via* ERK1/2 activation has been reported in different cancers, both *in vitro* and *in vivo*<sup>3,18</sup>. These observations suggest that ERK inhibition could overcome TKI resistance. Moreover, concomitant blockade of ERK1/2 and FLT3 signaling pathways may provide clinical benefit for the treatment of a subset of patients with AML, as previously suggested<sup>16,21,22</sup>.

In recent years, there has been great interest in developing clinically effective small-molecule inhibitors of MEK, the kinase upstream of ERK1/2, to inhibit the Ras-Raf-MEK-ERK1/2 pathway in cancer<sup>23</sup>. In the setting of AML, the MEK inhibitor trametinib has produced good results in preclinical models<sup>24</sup>, and it has been approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of several types of cancer. Trametinib was recently evaluated in a phase I/II study in patients with relapsed/refractory leukemia, showing activity in *RAS*-mutated AML<sup>25</sup>. Similarly, it has produced encouraging results in combination with TKIs in preclinical xenograft models of renal cell carcinoma<sup>26</sup>.

The present study provides evidence for the potential therapeutic benefit of the combination of the FLT3 inhibitor midostaurin and the MEK inhibitor trametinib, not only in patients with mutated *FLT3*, but also in those without the mutation. The MEK inhibitor trametinib remained potent in TKI-resistant cells and exerted strong synergy when combined with midostaurin in mutated and wild-type *FLT3* blast cells. Finally, the combination demonstrated statistically significant survival improvements in *in vivo* models when compared with vehicle and monotherapy groups.

## Methods

**Cell cultures, patients and healthy donors, and drugs.** Human MOLM-13 (*FLT3*<sup>ITD/WT</sup>) and OCI-AML3 (*FLT3*<sup>WT/WT</sup>) AML cell lines were obtained from the DSMZ culture collection (Braunschweig, Germany). MOLM-13 TKI-resistant cells (MOLM-13R) were produced from parental MOLM-13 after sustained and increasing exposure to sorafenib. For experiments of sorafenib-resistant cell enrichment (n = 3), 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE)-stained MOLM-13 cells were treated with 5 μM sorafenib over 48 hours, and then proliferative and viable cells (CFDA-SE+, Annexin V-) were sorted on the FACS Aria™ Fusion sorter platform (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

For experiments on primary cells, mononuclear cells were obtained from patients with AML or healthy donors by standard density gradient centrifugation on Ficoll cushions. The main characteristics of the patients are summarized in Table 1. The study was approved by the *Comité Ético de Investigación Clínica* of the *Instituto de Investigación Biomédica* of the *Hospital 12 de Octubre*, and all patients and donors provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Sorafenib and trametinib were purchased from Selleck Chemicals (Houston, TX, USA). Midostaurin was purchased from MedChemExpress (Sollentuna, Sweden). For details see *Supplementary Information*.

**Whole exome sequencing.** Exonic sequences from genomic DNA samples of patient #1 (bone marrow) at diagnosis were isolated, captured, amplified, and purified following the Ion TargetSeq™ Exome Enrichment manual (MAN0006730, Life Technologies S.A., Madrid, Spain). Sequencing was carried out on the Ion Proton™ System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The Ion PGM system (ThermoFisher Scientific) was used for results validation. For details see *Supplementary Information*.

**Liquid chromatography tandem-mass spectrometry analysis.** Samples were lysed and digested following the standard filter-aided sample preparation method. Phosphopeptides were enriched in TiO<sub>2</sub> micro-columns and analyzed by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) using an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (ThermoFisher Scientific). The MaxQuant and MaxLFQ platforms were used for analysis and quantification, respectively. Further data analysis was performed with Perseus. For details see *Supplementary Information*.

**Histopathology and immunohistochemistry.** Paraffin-embedded tissues from patients or mice were used for phospho-ERK1/2 (ref. 4370) or human CD45<sup>27</sup> (ref. 13917) detection, respectively (both from Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA). Slides were counterstained with Carazzi's hematoxylin solution (PanReac AppliChem, Darmstadt, Germany). For details see *Supplementary Information*.

**Immunoblotting assays.** Whole cell lysates from drug-treated cultured cells or AML patients' mononuclear cells were analyzed by western blotting (n = 3). Densitometry analysis of protein expression was corrected for housekeeping protein expression and normalized to control samples. For details see *Supplementary Information*.

**Drug sensitivity assay.** Cell viability after monotherapy and combinational treatment was determined after 48 or 72 hours of exposure to drugs or dimethyl sulfoxide (DMSO) in cell lines (n = 3–6) or primary cells (n = 5),

Demographic data			Clinical features							Performed analysis	
P (#)	Sex (M/F)	Age (y)	AML subtype (FAB)	Moment	Sample type	Blasts (%)	Cytogenetics (FISH)	FLT3 status	Other mutations	TKI treatment	Methods
1	M	71	M1	Diagnosis	BM	80	46, XY	L576P	No	Sorafenib	A
				d + 5	PBMC	67 (PB)					B
				d + 15	PBMC	40 (PB)					C
				d + 188	PBMC	81 (PB)					C
				d + 191	PBMC	81 (PB)					B
				d + 195	PBMC	81 (PB)					B
2	M	63	M1	Diagnosis	BM clot	93	47, XY; der (2;8), +5, -7, +8	L576Q	No	Sorafenib	D
				Relapse	BM clot	35					D
3	F	36	M2	Diagnosis	BM clot	77	46, XX	ITD	NPM1, DNMT3A, CBL	Midostaurin	D
				Relapse	BM clot	39					D
4	M	66	M1	Relapse	BMMC	94	46, XY; +13, -21	WT	biCEBPA	No	E
5	F	59	M5	Diagnosis	BMMC	71	46, XX; del (8p)	WT	NPM1	No	E
6	M	76	M1	Relapse	BMMC	40	46, XY; -21	WT	No	No	E
7	M	75	M1	Diagnosis	BMMC	90	46, XY; del (8p)	WT	CEBPA	No	E
8	F	57	M5	Diagnosis	BMMC	78	47, XX; +8, inv (16) (p13q22)	WT	CBFB/ MYH11	No	E

**Table 1.** AML patients' main characteristics P (#), patient number; M, male; F, female; y, years; d +, day; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; BM, bone marrow; BMMC, bone marrow mononuclear cells; PB, peripheral blood; ITD, internal tandem duplication; WT, wildtype; biCEBPA, biallelic CEBPA mutations; TKI, tyrosine kinase inhibitor; A, whole exome sequencing; B, western blot; C, liquid chromatography tandem-mass spectrometry analysis; D, immunohistochemistry analysis; E, drug sensitivity assay.

respectively, using the Cell Counting Kit-8 reagent from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)<sup>28–30</sup>. For monotherapy treatments, the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) values were determined according to a nonlinear regression program (GraphPad Prism 5.01; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). For combinational treatments the combination index (CI) was calculated using Calcsyn software (Biosoft, Great Shelford, Cambridge, UK) or Compusyn software (ComboSyn Inc., Biosoft; Cambridge, UK), based on the Chou and Talalay method<sup>31</sup>. For details see *Supplementary Information*.

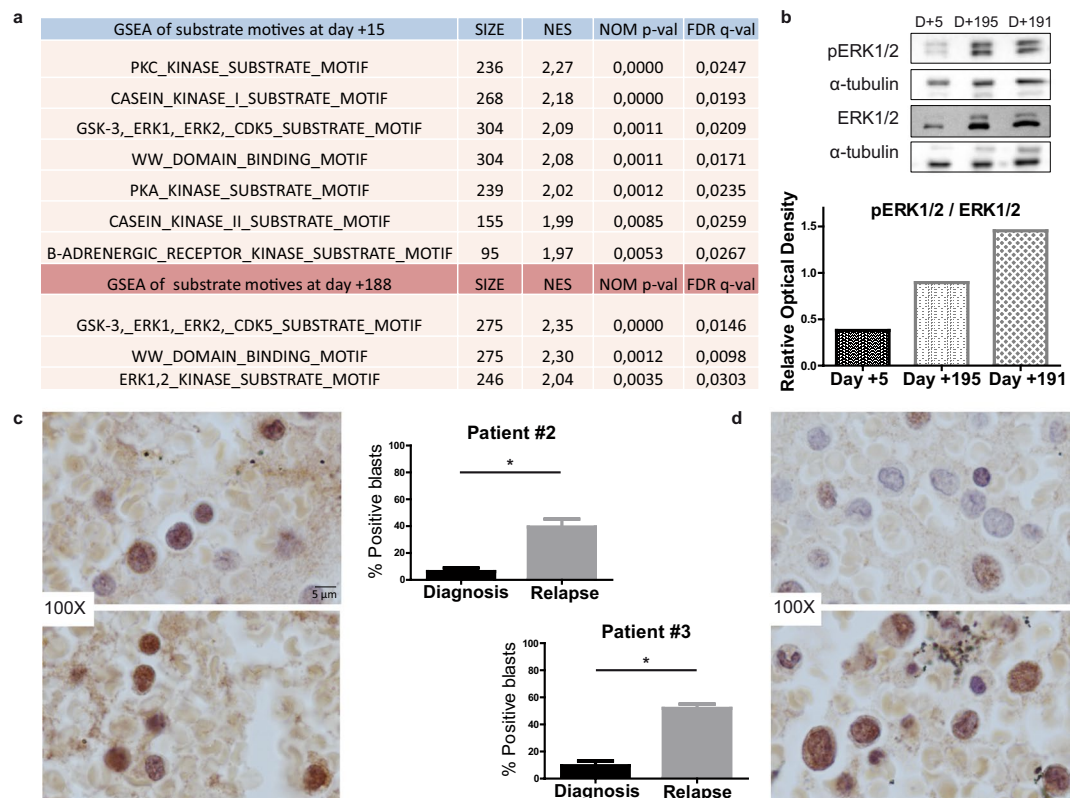
**Colony-forming unit assays.** To test treatment-related toxicity, CD34+ cells from healthy donors ( $n = 3$ ) were exposed to the corresponding drugs or DMSO in methylcellulose medium (Methocult Express ref. 4437, StemCell Technologies SARL, Grenoble, France). Colony-forming units (CFU- granulocyte-monocyte and erythroid colonies)<sup>32</sup> were scored on day 13. For details see *Supplementary Information*.

**In vivo studies.** Female 5–6 week old NSG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl/SzJ</sup>) mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) were injected with  $5 \times 10^6$  OCI-AML3 ( $FLT3^{WT/WT}$ ) cells. Mice were treated daily with vehicle (10% DMSO,  $n = 7$ ), trametinib (0.5 mg/kg,  $n = 7$ )<sup>24</sup>, midostaurin (50 mg/kg,  $n = 7$ )<sup>33</sup> or the combination of both ( $n = 6$ ) over 14 continuous days, and sacrificed when AML symptoms appeared along the experimental period of 57 days. Experiments involving animals were conducted at the Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) in accordance with National and International Guidelines for Animal Care. The study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Comunidad de Madrid on April 18<sup>th</sup> 2017. For details see *Supplementary Information*.

**Statistical analysis.** Data are presented as the mean and standard error of the mean (sem) or median values for survival analysis. Comparisons of means of variables between different groups were performed using the parametric Student's *t* test (two-sided) when the population followed a Gaussian distribution, or the non-parametric Mann-Whitney test when they did not. Overall survival curves were performed using the Kaplan-Meier estimation, and the Mantel-Cox test was used for comparisons between groups. Univariable Cox proportional hazard ratio (HR) models were applied to investigate the influence of treatment in overall survival. A  $P \leq 0.05$  was considered significant. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism software and SPSS v23 statistics software (North Castle, NY, USA).

## Results

**ERK1/2 pathway is activated in TKI-treated FLT3-mutated patients.** Between 2008 and 2016, five patients with AML with mutated *FLT3* received TKI treatment in our hospital and, after a few months, three of them developed resistance (patients #1, #2, and #3, see Table 1). Patient #1 was diagnosed with AML, French-American-British (FAB) classification M1, presenting a point mutation in the JMD of *FLT3* (L576P). Whole exome sequencing was used to confirm the absence of mutations in genes related to the main *FLT3* downstream signaling pathways (ERK1/2, PI3K/AKT, and JAK/STAT). The patient was included in the PANOBINODARA



**Figure 1.** ERK1/2 is activated after continued TKI treatment in *FLT3*-mutated AML. **(a)** Venn diagram of enriched substrate motifs at the two points of treatment in patient #1. **(b)** Western blot of phospho-ERK1/2 levels on different days **(D)** of treatment in patient #1. **(c)** Immunohistochemistry analysis of phospho-ERK1/2 levels of patient #2 at diagnosis (above) and relapse after TKI treatment (below). **(d)** Immunohistochemistry analysis of phospho-ERK1/2 levels in patient #3 at diagnosis (above) and relapse after TKI treatment (below). \* $P < 0.05$ . Scale bar: 5  $\mu$ m.

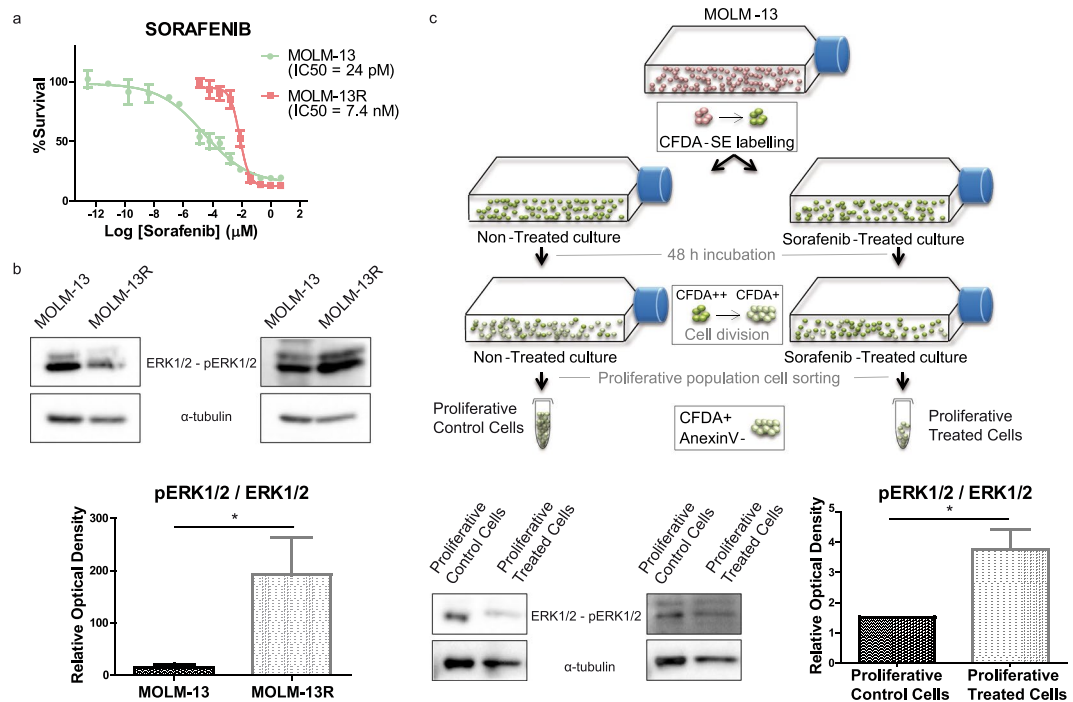
clinical trial (NCT00840346), but relapsed after some months. Compassionate use of sorafenib was administered after informed consent and institutional review board approval. Despite a good initial response, the disease progressed and the patient died 33 months after AML diagnosis.

Two peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples from patient #1 (day +15 and +188 of sorafenib treatment) were analyzed by LC-MS/MS after phosphopeptide enrichment. We performed Kinase Set Enrichment Analysis of substrate motifs using MaxQuant software. The library was used to predict the putative kinase activities responsible for the input set of identified phosphosites. The analysis revealed seven enriched substrate motifs at the beginning of the treatment (day +15) and three enriched substrate motifs after sustained TKI treatment (day +188). ERK1/2 kinase substrate motif was the only motif identified at day 188 but not at day +15, indicating increased ERK1/2 activity after persistent TKI treatment (Fig. 1a).

We then analyzed phospho-ERK1/2 levels of three different PBMC samples from patient #1 (day +5, day +191, and day +195 of sorafenib treatment) by western blotting, finding that ERK phosphorylation levels were significantly higher after 6 months of sorafenib treatment (Fig. 1b).

To corroborate this potential mechanism of TKI resistance, we analyzed the levels of phospho-ERK1/2 levels in the other two TKI-treated patients. Patient #2 was also diagnosed with AML-M1, with a point mutation in the JMD of *FLT3* (L576P). After several therapeutic lines, compassionate use of sorafenib was administered after informed consent and institutional review board approval, and the patient achieved a hematological response for 5 months. Thereafter, bone marrow analysis revealed the recurrence of blasts, and the patient relapsed and died 22 months after AML diagnosis. Patient #3 was diagnosed with AML-M2 with *FLT3*-ITD mutations and was recruited to a midostaurin clinical trial (NCT00651261). But despite having an initial good response, the patient relapsed 5 months later and died 8 months after AML diagnosis.

Paraffin-embedded bone marrow clots at diagnosis and relapse from patients #2 and #3 were analyzed by immunohistochemistry for phospho-ERK1/2 expression. The percentage of stained blasts was calculated before TKI treatment and at relapse. Significant differences were observed in both patients, with an increase in pERK1/2-positive blasts after TKI treatment. Higher levels of the phosphorylated form were recorded in patient #2 (Fig. 1c) and patient #3 (Fig. 1d) at relapse. These findings corroborate those observed in patient #1 by phosphoproteomics.



**Figure 2.** ERK1/2 pathway is activated after TKI-resistance *in vitro*. **(a)** Dose-response curve of sensitive or resistant (R) MOLM-13 cells. The  $\text{IC}_{50}$  value for sorafenib was almost 300 times higher than the control  $\text{IC}_{50}$  value in MOLM-13R cells. **(b)** pERK/ERK protein levels measured by western blotting in sensitive and resistant MOLM-13 cultures. The intensity of each band was normalized to the corresponding  $\alpha$ -tubulin value.  $*P \leq 0.05$ . **(c)** pERK/ERK levels of proliferative MOLM-13 cultures stained with CFDA-SE and sorted after 48 h of sorafenib treatment. pERK and ERK levels were analyzed by western blotting and normalized to  $\alpha$ -tubulin.  $*P \leq 0.05$ .

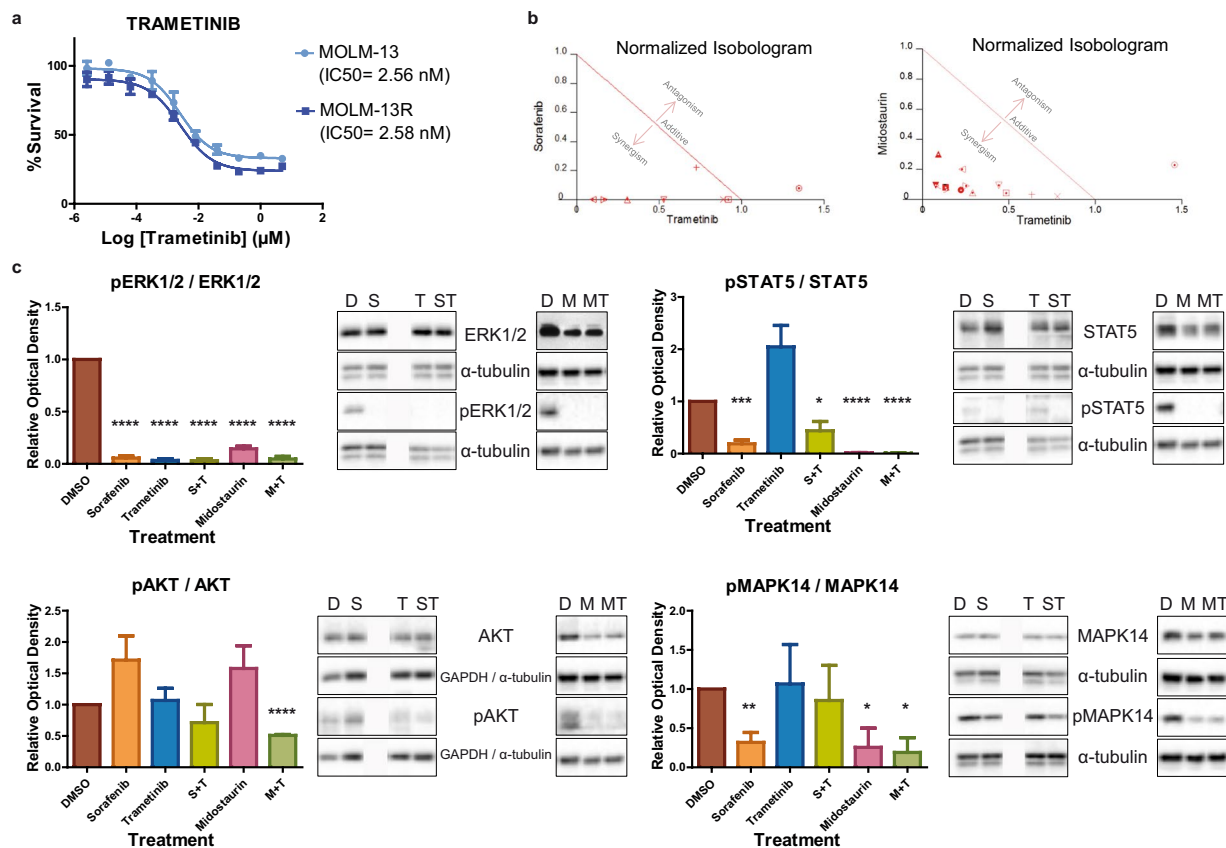
**ERK1/2 pathway is activated after TKI resistance *in vitro*.** Given these findings, we next tested whether ERK phosphorylation could be induced by the TKI treatment *in vitro*. To study resistance mechanisms, we used the MOLM-13 cell line that expresses *FLT3*-WT and *FLT3*-ITD. We observed that sustained treatment with increasing doses of sorafenib resulted in acquired resistance. This resistant cell line (MOLM-13R) was approximately 300-times less sensitive to sorafenib than the sensitive MOLM-13 cell line, which presented an  $\text{IC}_{50}$  value in the picomolar range ( $\text{IC}_{50}$  values are shown in Fig. 2a). We next studied the effect of the TKI midostaurin and observed cross-resistance in the MOLM-13R cell line but effectiveness in sensitive MOLM-13 cells, with an  $\text{IC}_{50}$  value in the nanomolar range (see *Supplementary Information*, Supplementary Fig. S1).

Western blot analysis revealed that the MOLM-13R cell line showed significantly higher expression of pERK1/2 than parental MOLM-13 cells (Fig. 2b), similar to our observations in *ex vivo* patient cells (Fig. 1b). To validate ERK activation as a common mechanism of TKI resistance, we analyzed the resistant population selected after 48 h of sorafenib treatment *in vitro* using the same cell line background. Live treated proliferative cells (CFDA+ and Annexin V-), separated by sorting (see *Supplementary Information*, Supplementary Fig. S2), exhibited higher ERK1/2 phosphorylation levels than DMSO-treated control (Fig. 2c).

### Trametinib is effective and has a synergistic effect with TKI in MOLM-13 and MOLM-13R cells.

The apparent upregulation of the ERK1/2 pathway in TKI-resistant AML prompted us to hypothesize that patients with AML might benefit from ERK inhibition. We thus tested whether the MEK inhibitor trametinib is effective against both sensitive and TKI-resistant MOLM-13 cells. Both cell lines were equally sensitive to trametinib, which efficiently inhibited cell growth *in vitro* in the low nanomolar range ( $\text{IC}_{50}$  MOLM-13 = 2.56 nM,  $\text{IC}_{50}$  MOLM-13R = 2.58 nM, Fig. 3a). These results indicate that there was no cross-resistance to trametinib in the tested cell lines, and suggest that trametinib may be beneficial in the context of TKI-resistant *FLT3*-mutated AML.

As trametinib in combination with TKIs might prevent the development of resistance, we next determined the effects of combining trametinib with sorafenib or midostaurin. Trametinib doses from 20 nM to 2.5 nM were tested with different doses of sorafenib (5 nM to 5 fM), and midostaurin (40 nM to 1.25 nM) to determine the CI. To be more restrictive, we only considered strong synergism when the CI was  $\leq 0.5$ . After 48 h of simultaneous treatment, strong synergistic effects were observed for both combinations (Fig. 3b), indicating that the combination of trametinib with either of the tested TKIs potentiated the inhibition of MOLM-13 cell growth. The effects of combining trametinib (200 nM to 12.8 pM) with midostaurin (5  $\mu\text{M}$  to 64 pM) were also evaluated in MOLM-13R cells. Strong synergistic effects were observed in the TKI-resistant MOLM13-R cell culture (*Supplementary Information*, Supplementary Fig. S3a).



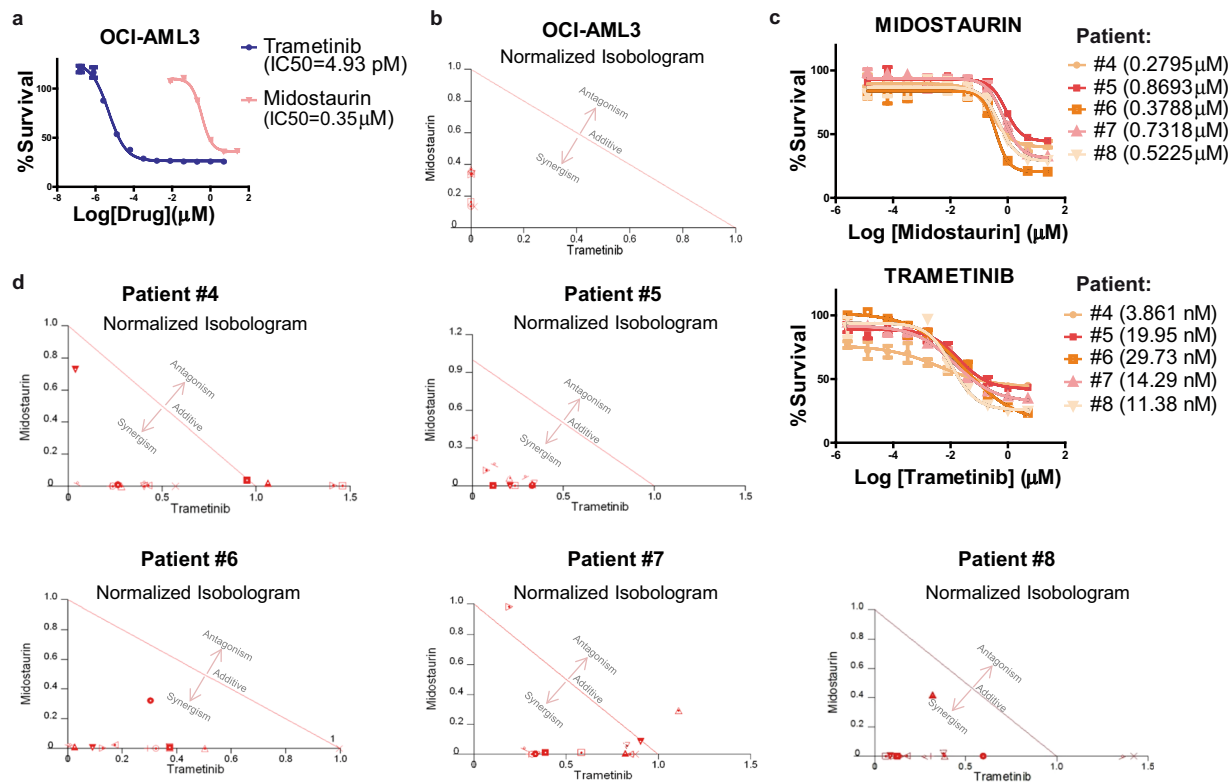
**Figure 3.** Trametinib effectively inhibits MOLM-13 and MOLM-13R cells and synergizes with sorafenib or midostaurin in MOLM-13 cells. **(a)** Dose-response curve of trametinib in sensitive and resistant (R) MOLM-13 cells. **(b)** Normalized isobolograms for trametinib in combination with the TKIs sorafenib and midostaurin in MOLM-13 cells. **(c)** The levels of ERK1/2, STAT5, AKT, and MAPK14 and their phosphorylated forms were analyzed by western blotting in TKI-sensitive MOLM-13 cultures after monotherapy or combined drug treatments (200 nM of each treatment for 3 hours). Representative blots of three independent experiments, yielding equivalent results, are shown. \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ .

**Midostaurin + trametinib is the most effective combination of drugs *in vitro*.** To explore the effects of the different drugs on FLT3 downstream signaling pathways, we tested drugs *in vitro* as monotherapy or in combination in MOLM-13 cells. Because a rebound phenomenon has been described after TKI treatment, with profound early inhibition followed by increasing ERK phosphorylation after incubation periods of 8–24 hours<sup>22</sup> we chose a shorter time window (3 hours).

Western blot analysis indicated a complete loss of pERK signaling after treatment with sorafenib, midostaurin, trametinib, and their combinations (Fig. 3c). Similarly, phospho-STAT5 levels were significantly decreased relative to the DMSO control after sorafenib or midostaurin treatment (Fig. 3c). By contrast, trametinib treatment led to a non-significant increase in pSTAT5 levels, but its combination with sorafenib or midostaurin reversed this trend. Analysis of AKT phosphorylation showed that whereas trametinib treatment had no effect on pAKT levels, its combination with the TKIs resulted in diminished pAKT levels, which was significant for the trametinib plus midostaurin combination. The same effects were observed after sustained TKI treatment, in TKI-resistant MOLM13-R cells (*Supplementary Information*, Supplementary Fig. S3b).

Finally, we also analyzed MAPK14 activation because of its role in the development of sorafenib resistance in other types of tumors<sup>18</sup>. Similar to the results for AKT phosphorylation, trametinib had no effect on pMAPK14 levels, whereas sorafenib and midostaurin diminished them (Fig. 3c). Midostaurin plus trametinib was the only combination that notably decreased pMAPK14 levels. Thus, trametinib plus midostaurin seems to be the most effective combination, as it was capable of inhibiting the four analyzed pathways.

**Midostaurin + trametinib exhibit synergy *in vitro* and *ex vivo* on FLT3 wild-type AML.** Because midostaurin has activity against both mutated and wild-type FLT3, and the receptor is activated in almost all types of AML, its combination with trametinib might be a promising treatment for AML. We first tested whether ERK phosphorylation could also be induced by TKI treatment *in vitro* in the FLT3-WT cell line OCI-AML3. To do this, we treated OCI-AML3 cells with increasing doses of midostaurin. Western blot analysis revealed that this new resistant cell line showed higher expression of pERK1/2 than parental cells (*Supplementary Information*, Supplementary Fig. S4a).



**Figure 4.** Midostaurin plus trametinib exert synergistic cytotoxicity in *FLT3*-WT AML samples *in vitro* and *ex vivo*. **(a)** Dose-response curve of trametinib and midostaurin in an *FLT3*-WT culture (OCI-AML3). **(b)** Normalized isobolograms for trametinib in combination with the TKI midostaurin in *FLT3*-WT OCI-AML3 cells. **(c)** Dose-response curve of midostaurin and trametinib in five *ex vivo* *FLT3*-WT AML samples. **(d)** Normalized isobolograms for trametinib in combination with the TKI midostaurin in five *ex vivo* *FLT3*-wildtype AML samples.

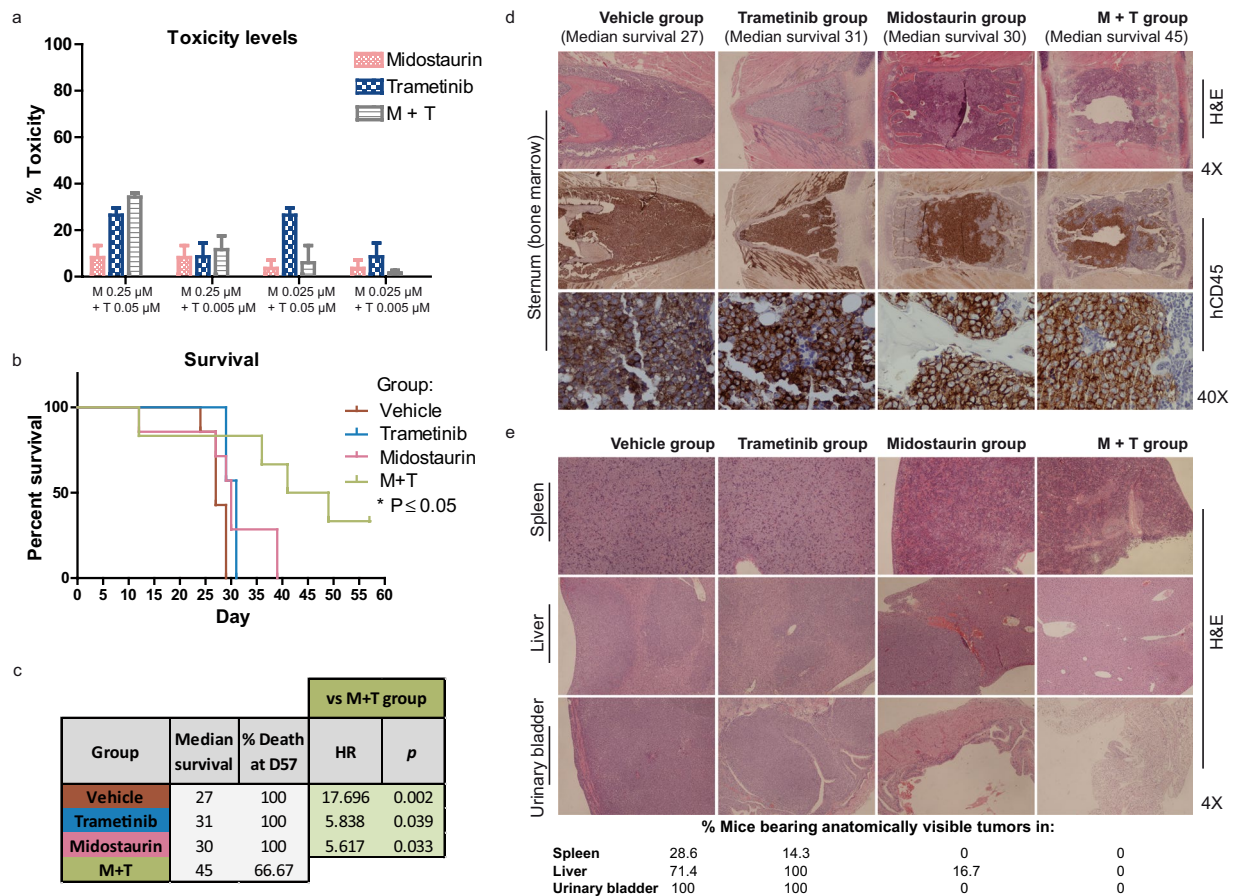
Both drugs were effective as monotherapy (Fig. 4a) and in combination (strong synergy,  $\text{CI} \leq 0.5$ ) (Fig. 4b) in the *FLT3*-WT cell line (OCI-AML3). Sorafenib was also effective as monotherapy (data not shown), but its combination with trametinib did not produce strong synergy ( $\text{CI} \geq 0.5$ ).

To study the possible role of MEK inhibition in the prevention of the emergence of acquired TKI resistance in *FLT3*-WT background, we examined the resistant population after 48 h of treatment of OCI-AML3 cells with midostaurin, trametinib or their combination. Live treated proliferative cells (CFDA+ and Annexin V-) showed decreased survival after the combination *versus* midostaurin alone (Supplementary Information, Supplementary Fig. S4b).

The enhanced antileukemic activity of trametinib plus midostaurin suggests that simultaneous inhibition of the ERK1/2 pathway and *FLT3* signaling (wild-type or mutated) might be an effective treatment strategy for AML patients. We thus tested this combination *ex vivo* in cells from five patients (patient #4 to patient #8, all with *FLT3*-WT, see Table 1). Cytotoxicity and strong synergy ( $\text{CI} \leq 0.5$ ) were observed in each case;  $\text{IC}_{50}$  values for midostaurin were 0.28–0.87  $\mu\text{M}$ , and for trametinib 3.86–29.73 nM (Fig. 4c), which are in line with the  $\text{IC}_{50}$  values obtained *in vitro*. Also, strong synergy effects ( $\text{CI} \leq 0.5$ ) were observed in the majority of tested combinations (Fig. 4d). Overall, these results support the use of midostaurin + trametinib in *FLT3*-WT AML cells.

**Midostaurin + trametinib is safe *ex vivo* in healthy CD34+ cells.** To test whether the combination of midostaurin plus trametinib could affect the colony formation of granulocyte-monocyte or erythroid colonies, we tested different combinational doses within the range of combination  $\text{IC}_{50}$  values observed for leukemic AML cells. Similar doses were able to inhibit leukemic cell growth without affecting healthy progenitor cells. Only mild cytotoxicity was observed at 0.25  $\mu\text{M}$  midostaurin plus 0.05  $\mu\text{M}$  trametinib (Fig. 5a), and slight toxicity, if any, was observed in the remainder of the assayed combinations. We would assume that the toxicity would be the same, or lower with each drug used separately.

**Midostaurin + trametinib significantly improves survival over monotherapy in an *in vivo* AML model.** Finally, to verify the efficacy and safety of the combination, we performed an *in vivo* study with OCI-AML3 cells injected into NSG mice. We found statistically significant survival differences between the midostaurin + trametinib combination (M + T) and the vehicle (V) group ( $P = 0.0134$ ), the M + T and the T group ( $P = 0.0153$ ), and the M + T and the M group ( $P = 0.0295$ ), with the combination treatment significantly improving survival rates (Fig. 5b). Median survival in days was V (27), T (31), M (30) and M + T (45) and the



**Figure 5.** Midostaurin plus trametinib is safe in healthy donor cells and significantly improves survival over monotherapy *in vivo* (a) Toxicity levels for both colony populations (granulocyte-monocyte or erythroid CFU) at indicated doses after 13 days of growth in methylcellulose medium. Data are expressed as percentage of toxicity relative to DMSO control ( $n = 3$ ). (b) Survival curves of vehicle, trametinib, midostaurin and combination groups from *in vivo* studies. Statistically significant differences between combination group and vehicle ( $*P = 0.0134$ ), combination and midostaurin group ( $*P = 0.0295$ ), and combination and trametinib group ( $*P = 0.0153$ ) were observed, with the combination treatment significantly improving survival. (c) Table showing median survival in days, % death at day 57 and hazard ratio and p-values from each group of treatment. (d) Representative hematoxylin and eosin (H&E) and human-CD45 stained sternum slides at 4X and 40X showing OCI-AML3 cell infiltration in bone marrow. (e) H&E stained slides from spleen, liver and urinary bladder showing tumor or non-tumor sections in each case. The percentage of mice bearing anatomically visible tumors from each treatment group is represented below.

percentage of death at the end of the experiment was 66.7% for M + T and 100% for the other groups (Fig. 5c). We then compared the risk of death from each treatment group *versus* combination group based on hazard ratio analysis: vehicle group [HR, 17.696; 95%CI, 2.965–105.613;  $P = 0.002$ ], trametinib group [HR, 5.838; 95%CI, 1.090–31.255;  $P = 0.039$ ] and midostaurin group [HR, 5.617; 95%CI, 1.150–27.437;  $P = 0.033$ ]. These results highlight the efficacy of the combination of trametinib plus midostaurin *in vivo*.

Histopathology examination of hematoxylin and eosin (H&E)- and human-CD45-stained bone marrow samples from mice showed proliferation of OCI-AML3 cells *in vivo* in all groups at necropsy (Fig. 5d). Remarkably, at the end of the experiment, two of the six mice in the combination treatment group did not show apparent leukemia symptoms, and one mouse had no infiltration of AML blasts in bone marrow, demonstrating that the combination controlled the progression of the disease for a longer period of time than the other groups. Histological examination of H&E-stained slides from spleen, liver and urinary bladder revealed some extramedullary tumors in vehicle, trametinib and midostaurin groups, but none were found in the combination treatment group (Fig. 5e). The percentage of mice bearing anatomically visible tumors is represented in Fig. 5e.

Taken together, the present data show that the combination of trametinib plus midostaurin can efficiently improve survival and control the progression of the disease for a longer period of time than monotherapy. These data also support the applicability of the combination in the context of AML *FLT3* wildtype.

## Discussion

Distinct mutations in *FLT3* lead to the constitutive activation of the receptor and its downstream pathways<sup>3–6,17,34–36</sup>. Several TKIs that achieve sustained *in vivo* inhibition of *FLT3* have exhibited highly promising activity in early clinical studies<sup>10,34</sup>; however, none of them are able to ensure remission of AML as a single treatment<sup>9</sup>, primarily because of secondary resistance. Among the possible mechanisms for these failures is the existence of independent alternative survival pathways, such as casein kinase 2 alpha, CD47, CD123, PIM, PI3K/AKT/mTORC, JAK/STAT, and MAPK<sup>1,3,16–20</sup>. In the present study, we demonstrate that ERK activation is a common mechanism of TKI resistance *in vitro* and *ex vivo*. We detected ERK activation in an *FLT3*-mutated cell culture using two different means of resistance selection. Also, PBMCs from different patients harboring *FLT3* mutations showed sustained ERK activation after the development of TKI resistance, as demonstrated by phosphoproteomics, western blotting, and immunohistochemistry, with increased levels of pERK observed in the cytoplasm and nuclei of infiltrated blasts. pERK distribution is critical for substrate targeting in the nucleus (e.g., c-Fos and c-Myc) and the cytosol (e.g., ribosomal S6 kinases), although the mechanisms regulating this subcellular localization are unclear<sup>37</sup>. ERK activation has been previously suggested as a mechanism of TKI resistance, directly or indirectly, by the activation of upstream regulatory pathways<sup>3,17,22,38,39</sup>. Because of these results, we hypothesized that ERK inhibition, *via* its regulatory molecule MEK, might overcome TKI resistance, as suggested in other studies<sup>21,22,40</sup>. For example, Bruner *et al.*<sup>22</sup>, propose this combination after studying the incomplete response to TKI therapy in *FLT3*-ITD AML cells. According to these suggestions, we characterized the effect of the MEK inhibitor trametinib and its combination with the two TKIs sorafenib and midostaurin *in vitro*.

We demonstrate *in vitro* the potential use of trametinib in the context of *FLT3*-mutated AML, even in a background of TKI resistance. Indeed, previous studies have demonstrated the efficacy of trametinib in *RAS*-mutant AML<sup>24,25</sup>.

The activity of trametinib against TKI-resistant blasts suggests its possible use in combination with TKI to overcome resistance development. We therefore examined for synergism between trametinib and other TKIs, such as sorafenib, and midostaurin in order to look for the most beneficial combination. Of note, their combinations presented strong synergy ( $CI \leq 0.5$ ). Our *in vitro* results suggest that sorafenib is the most potent compound, and its combination with trametinib showed strong synergy. Indeed, a recent clinical trial<sup>41</sup> has evaluated the effect of trametinib plus sorafenib in patients with advanced hepatocellular cancer (NCT02292173), showing a good safety profile. Although sorafenib has shown encouraging results in AML clinical trials<sup>42,43</sup>, and it has been recommended for compassionate use in *FLT3*-mutated patients, it has not yet been approved. Whereas the addition of sorafenib to standard treatment in AML has not improved overall survival, the addition of midostaurin has resulted in a significant overall survival benefit<sup>44</sup> and better tolerance than sorafenib<sup>45</sup>. In 2017, midostaurin plus chemotherapy was approved by the FDA for use in AML. In line with these results, we also observed a strong potency of midostaurin in *FLT3*-mutated cell lines and strong synergy when midostaurin was combined with trametinib in sensitive and TKI-resistant cultures. Interestingly, this combination was the only one able to inhibit the downstream *FLT3* pathways described as potential mechanisms of resistance<sup>1,3,16,17,19,20</sup>.

As *FLT3*-WT and *FLT3* mutants<sup>46</sup> are sensitive to midostaurin, and the receptor is activated in almost all types of AML<sup>4,9,47,48</sup>, we would propose the extended use of its combination with trametinib, even in *FLT3*-WT patients. In this context, we demonstrate for the first time that ERK was also activated after sustained TKI treatment. Our results show that both compounds in monotherapy remain active against *FLT3*-WT *in vitro* and *ex vivo*. Interestingly, the  $IC_{50}$  obtained *in vitro* correlated with the *ex vivo* results. The combination was also synergistic *in vitro* and *ex vivo*, and showed no associated toxicity in CD34+ cells from healthy donors. Compellingly, the combination resulted in statistically significant improvements *in vivo* compared with control and single therapy groups. While the present study shows that trametinib is beneficial in the context of TKI resistance and the prevention of the emergence of resistance even in the *FLT3*-WT background, further studies will be needed to explore other potential pathways involved in dual resistance, which will hopefully facilitate new prevention strategies.

The ERK1/2 pathway is a relevant resistance mechanism in patients with AML treated with TKIs. Our data provide clear evidence of the potential therapeutic benefit of the combination of the *FLT3* inhibitor midostaurin and the MEK inhibitor trametinib, not only in *FLT3*-mutated patients as previously suggested<sup>22</sup>, but also in those without the mutation, which increases the range of patients that could obtain benefits from the drug combination. This combination is synergistic *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo*. Lastly, the combination improves the survival rate *in vivo*. Overall, these data support a clinical trial of midostaurin plus trametinib in AML.

## Conclusions

ERK1/2 activation can promote TKI resistance in AML. We demonstrate that inhibition of the ERK1/2 pathway with trametinib, along with the use of a TKI, such as midostaurin, could be a beneficial therapeutic strategy in patients with AML and mutated or non-mutated *FLT3*.

**Ethics approval and consent to participate.** Studies involving human data and tissues were approved by our Institutional Review Board and all patients provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Studies involving animals were conducted in accordance with National and International Guidelines for Animal Care and the study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Comunidad de Madrid on April 18th 2017.

Received: 21 June 2019; Accepted: 19 November 2019;

Published online: 09 December 2019

## References

- Hart, S. *et al.* Pacritinib (SB1518), a JAK2/FLT3 inhibitor for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* **1**, e44, <https://doi.org/10.1038/bcj.2011.43> (2011).
- Dany, M. *et al.* Targeting FLT3-ITD signaling mediates ceramide-dependent mitophagy and attenuates drug resistance in AML. *Blood* **128**, 1944–1958, <https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-708750> (2016).
- Weisberg, E. *et al.* Reversible resistance induced by FLT3 inhibition: a novel resistance mechanism in mutant FLT3-expressing cells. *PLoS One* **6**, e25351, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025351> (2011).
- Chen, C.-T. *et al.* Identification of a potent 5-phenyl-thiazol-2-ylamine-based inhibitor of FLT3 with activity against drug resistance-conferring point mutations. *Eur. J. Med. Chem.* **100**, 151–161, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.05.008> (2015).
- Reindl, C. *et al.* Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* **107**, 3700–3707, <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2596> (2006).
- Griffith, J. *et al.* The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol. Cell* **13**, 169–178, [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00505-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00505-7) (2004).
- Breitenbuecher, F. *et al.* Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood* **113**, 4074–4077, <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-125476> (2009).
- Krakowsky, R. H. E. *et al.* miR-451a abrogates treatment resistance in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* **8**(3), 36, <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0070-y> (2018).
- Lindblad, O. *et al.* Aberrant activation of the PI3K/mTOR pathway promotes resistance to sorafenib in AML. *Oncogene* **35**, 5119–5131, <https://doi.org/10.1038/ncr.2016.41> (2016).
- Stone, R. M. *et al.* Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N. Engl. J. Med.* **377**, 454–464, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614359> (2017).
- Jiao, Q. *et al.* Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol. Cancer* **17**, <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0801-5> (2018).
- Giri, S., Hamdeh, S., Bhatt, V. R. & Schwarz, J. K. Sorafenib in Relapsed AML With FMS-Like Receptor Tyrosine Kinase-3 Internal Tandem Duplication Mutation. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* **13**, 508–514, <https://doi.org/10.6004/jnccn.2015.0070> (2015).
- Röllig, C. *et al.* Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* **16**, 1691–1699, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00362-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00362-9) (2015).
- Gallo, M. M. & Lazarus, H. M. Midostaurin: an emerging treatment for acute myeloid leukemia patients. *J. Blood Med* **7**, 73–83, <https://doi.org/10.2147/JBM.S100283> (2016).
- Stone, R. M. *et al.* The Multi-Kinase Inhibitor Midostaurin (M) Prolongs Survival Compared with Placebo (P) in Combination with Daunorubicin (D)/Cytarabine (C) Induction (ind), High-Dose C Consolidation (consol), and As Maintenance (maint) Therapy in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients (pts) Age 18-60 with FLT3 Mutations (muts): An International Prospective Randomized (rand) P-Controlled Double-Blind Trial (CALGB 10603/RATIFY [Alliance]). *Blood* **126**, 6–6, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614359> (2015).
- Piloto, O. *et al.* Prolonged exposure to FLT3 inhibitors leads to resistance via activation of parallel signaling pathways. *Blood* **109**, 1643–1652, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-023804> (2007).
- Grunwald, M. R. & Levis, M. J. FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: a review of their efficacy and mechanisms of resistance. *Int. J. Hematol.* **97**, 683–694, <https://doi.org/10.1007/s12185-013-1334-8> (2013).
- Rudalska, R. *et al.* *In vivo* RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer. *Nat. Med* **20**, 1138–1146, <https://doi.org/10.1038/nm.3679> (2014).
- Zeng, Z. *et al.* High-throughput profiling of signaling networks identifies mechanism-based combination therapy to eliminate microenvironmental resistance in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **102**, 1537–1548, <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.162230> (2017).
- Bardet, V. *et al.* Single cell analysis of phosphoinositide 3-kinase/Akt and ERK activation in acute myeloid leukemia by flow cytometry. *Haematologica* **91**, 757–764 (2006).
- Nishioka, C. *et al.* Blockade of MEK/ERK signaling enhances sunitinib-induced growth inhibition and apoptosis of leukemia cells possessing activating mutations of the FLT3 gene. *Leuk. Res.* **32**, 865–872, <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.09.017> (2008).
- Bruner, J. K. *et al.* Adaptation to TKI Treatment Reactivates ERK Signaling in Tyrosine Kinase-Driven Leukemias and Other Malignancies. *Cancer Res.* **77**, 5554–5563, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2593> (2017).
- Samatar, A. A. & Poulikakos, P. I. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 928–942, <https://doi.org/10.1038/nrd4281> (2014).
- Burgess, M. R. *et al.* Preclinical efficacy of MEK inhibition in Nras-mutant AML. *Blood* **124**, 3947–3955, <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-574582> (2014).
- Borthakur, G. *et al.* Activity of the oral mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor trametinib in RAS-mutant relapsed or refractory myeloid malignancies. *Cancer* **122**, 1871–1879, <https://doi.org/10.1002/ncr.29986> (2016).
- Bridgeman, V. L. *et al.* Preclinical Evidence That Trametinib Enhances the Response to Antiangiogenic Tyrosine Kinase Inhibitors in Renal Cell Carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 172–183, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0170> (2016).
- Saland, E. *et al.* A robust and rapid xenograft model to assess efficacy of chemotherapeutic agents for human acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* **5**, e297, <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.19> (2015).
- Gu, F.-M. Sorafenib inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by blocking STAT3. *World J. Gastroenterol.* **17**, 3922, <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i34.3922> (2011).
- Levis, M. *et al.* Plasma inhibitory activity (PIA): a pharmacodynamic assay reveals insights into the basis for cytotoxic response to FLT3 inhibitors. *Blood* **108**, 3477–3483, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015743> (2006).
- Qiu, J.-G. *et al.* Trametinib modulates cancer multidrug resistance by targeting ABCB1 transporter. *Oncotarget* **6**, 15494–509, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3820> (2015).
- Chou, T. C. & Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* **22**, 27–55, [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4) (1984).
- Yadav, N. K., Shukla, P., Omer, A., Singh, P. & Singh, R. K. Alternative methods in toxicology: CFU assays application, limitation and future prospective. *Drug Chem. Toxicol.* **39**, 1–12, <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.994217> (2016).
- Weisberg, E. *et al.* Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* **1**, 433–443, [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00069-7](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00069-7) (2002).
- Ustun, C., DeRemer, D. L., Jillella, A. P. & Bhalla, K. N. Investigational drugs targeting FLT3 for leukemia. *Expert Opin. Investig. Drugs* **18**, 1445–1456, <https://doi.org/10.1517/13543780903179278> (2009).
- Fischer, M. *et al.* Impact of FLT3-ITD diversity on response to induction chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* **102**, e129–e131, <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.157180> (2017).
- Kayser, S. *et al.* Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood* **114**, 2386–2392, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209999> (2009).
- Caunt, C. J. & McArdle, C. A. ERK phosphorylation and nuclear accumulation: insights from single-cell imaging. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 224–229, <https://doi.org/10.1042/BST20110662> (2012).

38. Hou, P. *et al.* A Genome-Wide CRISPR Screen Identifies Genes Critical for Resistance to FLT3 Inhibitor AC220. *Cancer Res.* **77**, 4402–4413, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1627> (2017).
39. Yang, X., Sexauer, A. & Levis, M. Bone marrow stroma-mediated resistance to FLT3 inhibitors in FLT3-ITD AML is mediated by persistent activation of extracellular regulated kinase. *Br. J. Haematol.* **164**, 61–72, <https://doi.org/10.1111/bjh.12599> (2014).
40. Zhang, W. *et al.* The Dual MEK/FLT3 Inhibitor E6201 Exerts Cytotoxic Activity against Acute Myeloid Leukemia Cells Harboring Resistance-Confering FLT3 Mutations. *Cancer Res.* **76**, 1528–1537, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1580> (2016).
41. Wang, E. *et al.* Phase I study of trametinib combined with sorafenib in patients (pts) with advanced hepatocellular cancer (HCC). *J. Clin. Oncol.* **37**, 431–431, [https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.4\\_suppl.431](https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.4_suppl.431) (2019).
42. Serve, H. *et al.* Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebocontrolled trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 3110–3118, <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.4990> (2013).
43. Chen, S.-W. *et al.* Phase 2 study of combined sorafenib and radiation therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **88**, 1041–1047, <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.01.017> (2014).
44. Braess, J. Akute myeloische Leukämie. *DMW - Dtsch. Med. Wochenschr.* **141**, 1748–1751, <https://doi.org/10.1055/s-0042-112505> (2016).
45. Bose, P., Vachhani, P. & Cortes, J. E. Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Curr. Treat. Options Oncol* **18**, 17, <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0456-2> (2017).
46. Hassanein, M., Almahayni, M. H., Ahmed, S. O., Gaballa, S. & El Fakih, R. FLT3 Inhibitors for Treating Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk* **16**, 543–549, <https://doi.org/10.1016/j.clml.2016.06.002> (2016).
47. Peschel, I. *et al.* FLT3 and FLT3-ITD phosphorylate and inactivate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **102**, 1378–1389, <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.160101> (2017).
48. Ozeki, K. *et al.* Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood* **103**, 1901–1908, <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-1845> (2004).

## Acknowledgements

We are particularly indebted to all the patients who participated in the study. This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI13/02378 and PI16/01530) and the CRIS foundation. M.L. had a postdoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (FPDI-2013-016409) and holds a grant from the Spanish Society of Hematology and Hemotherapy.

## Author contributions

M.L.M. and M.L. performed most of the experiments. A.A. generated MOM-13R cells. AOR helped in animal experimental design and execution. A.L. performed flow cytometry experiments. A.R.G. helped in animal necropsy and immunohistochemistry. A.A. and I.R. performed whole exome sequencing. I.Z. and M.Q.F. performed proteomic experiments. G.G.L. helped in proteomic data analysis. M.G. helped in immunohistochemistry imaging. N.C. and R.A. treated A.M.L. patients and obtained corresponding consents. M.L. and J.M.L. designed the study, supervised the experiments, and corrected and approved the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54901-9>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to M.L.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

***SUPPLEMENTARY INFORMATION FILE***

**MEK inhibition enhances the response to tyrosine kinase inhibitors  
in acute myeloid leukemia**

María Luz Morales, Alicia Arenas, Alejandra Ortiz-Ruiz, Alejandra Leivas, Inmaculada Rapado,  
Alba Rodríguez-García, Nerea Castro, Ivana Zagorac, Miguel Quintela-Fandino, Gonzalo  
Gómez-López, Miguel Gallardo, Rosa Ayala, María Linares & Joaquín Martínez-Lopez

## TABLE OF CONTENTS

<b>SUPPLEMENTARY METHODS</b> .....	3
<b>Extended cell cultures, AML and healthy primary cells and drugs</b> .....	3
<b>Extended whole exome sequencing</b> .....	4
<b>Extended LC-MS/MS analysis</b> .....	4
<i>Sample preparation for proteomic analysis</i> .....	4
<i>Phosphopeptide enrichment</i> .....	5
<i>Mass spectrometry</i> .....	5
<i>Data analysis</i> .....	6
<b>Extended Histopathology and Immunohistochemistry</b> .....	6
<b>Extended Immunoblotting assays</b> .....	6
<b>Extended Drug Sensitivity Assay</b> .....	7
<b>Extended colony-forming unit assays</b> .....	8
<b>Extended <i>in vivo</i> studies</b> .....	9
<b>SUPPLEMENTARY FIGURES</b> .....	10
<b>Supplementary Figure S1. IC50 dose-response to midostaurin in MOLM-13 and MOLM-13R</b> .....	10
<b>Supplementary Figure S2. Representative charts/plots from flow acquisition cell sorting</b> .....	10
<b>Supplementary Figure S3. The combination of midostaurin plus trametinib is synergistic and effective in MOLM-13R</b> .....	11
<b>Supplementary Figure S4. Midostaurin plus trametinib is beneficial in the context of TKI resistance in FLT3 wildtype</b> .....	12
<b>SUPPLEMENTARY TABLES</b> .....	13
<b>Supplementary Tables</b> .....	11
<b>Supplementary Table 1. Antibodies information</b> .....	13

## SUPPLEMENTARY METHODS

### Extended cell cultures, AML patients, healthy donors and drugs

Human MOLM-13 (FLT3<sup>ITD/WT</sup>) and OCI-AML3 (FLT3<sup>WT/WT</sup>) AML cell lines were obtained from the DSMZ culture collection (Braunschweig, Germany). Other mutations are available at the *Catalogue of Somatic Mutations* (COSMIC) website (COSMIC sample ID: COSS1330947 and COSS1290455 respectively). MOLM-13 cells were cultured in RPMI-1640 medium (Biowest, Nuaille, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). To induce resistance to sorafenib, the parental MOLM-13 cell line was grown in culture in the presence of 5 nM sorafenib, which was gradually increased to 20 nM over 17 days to obtain MOLM-13 resistant (MOLM-13R) cells. Culture media for MOLM-13R cells were supplemented with a final concentration of 20 nM sorafenib. The OCI-AML3 cell line was cultured in IMDM medium (Biowest, Nuaille, France) supplemented with 5% FBS. To induce resistance to midostaurin, the parental OCI-AML3 cell line was grown in culture in the presence of 0.1 µM midostaurin, which was gradually increased to 5 µM over 10 days to obtain the resistant culture (OCI-AML3R). All cell lines were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, and maintained by periodic subculture every 2–3 days.

For experiments of sorafenib-resistant cells enrichment, MOLM-13 sensitive cells were stained with 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and treated with 5 µM sorafenib for 48 h. APC Annexin V (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) staining was used to discard dead cells. Proliferative and viable cells (CFDA-SE+, Annexin V-) were sorted in a FACSAria™ Fusion sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Three experiments were performed independently. Cell pellets were stored at -80°C until use. For experiments of proliferative and viable cells in OCI-AML3 background, cells were treated with 25 µM midostaurin, 5 µM trametinib or their combination for 48 h after being stained with CFDA-SE.

For experiments with primary cells, bone marrow and peripheral blood samples from patients with AML diagnosed according to French-American-British (FAB) criteria at diagnosis and at different times of treatment were obtained. Bone marrow from healthy donors was aspirated after a medical interview. In both cases, mononuclear cells were separated by density

gradient centrifugation on Ficoll. The study was approved by the *Comité Ético de Investigación Clínica* of the *Instituto de Investigación Biomédica* of the *Hospital 12 de Octubre* and all patients and donors provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Sorafenib and trametinib were purchased from Selleck Chemicals (Houston, TX, USA). Midostaurin was purchased from MedChemExpress (Sollentuna, Sweden). Stock solutions were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) at 10 mM and serially diluted in culture medium to obtain the final concentrations for *in vitro* and *ex vivo* experiments. All stock solutions were stored at -80°C.

### **Extended whole exome sequencing**

A total of 1 µg of high-quality RNA-free genomic DNA was isolated from the bone marrow of patient #1 at diagnosis. Exonic sequences were captured through probe-hybridization, amplified, and purified following the Ion TargetSeq™ Exome Enrichment manual (MAN0006730, Life Technologies S.A., Madrid, Spain). The purified DNA was then sequenced on the Ion Proton™ System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Obtained sequence reads were aligned to the human genome reference sequence (hg19) in Torrent Suite 4.4.3. Point mutations and 1 base-pair indels were restricted to variants with mean allele frequency (MAF) < 0.1%,  $P < 0.05$ , and a minimum of 10 reads, supporting a call of at least 20 total reads. Indels were restricted to variants with MAF < 0.1%,  $P < 0.05$ , and a minimum of five reads supporting a call. The Ion PGM system (ThermoFisher Scientific) was used to validate the results.

### **Extended LC-MS/MS analysis**

Phosphoproteomic experiments were conducted at the Proteomics Core Unit of the Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

#### *Sample preparation for proteomic analysis*

Cells were lysed using 7 M urea and 2 M thiourea in 100 mM Hepes pH 7.5, supplemented with 1:1000 (v/v) of benzonase (Novagen) and 1:100 (v/v) of Halt™ phosphatase and protease inhibitor cocktail 100× (ThermoFisher Scientific). Protein concentration was determined using the Pierce® 660nm Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using BSA as standard. Samples (250 µg) were digested using the standard FASP protocol.

Briefly, proteins were reduced (15 mM TCEP, 30 min, room temperature), alkylated (50 mM CAA, 20 min in the dark, room temperature) and sequentially digested with Lys-C (Wako) (protein:enzyme ratio 1:50, overnight at room temperature) and trypsin (Promega) (protein:enzyme ratio 1:100, 6 h at 37 °C). Resulting peptides were desalted using C18 stage-tips.

#### *Phosphopeptide enrichment*

Phosphopeptides were enriched using home-made TiO<sub>2</sub> micro-columns. Briefly, peptides were resuspended in 6% trifluoroacetate (TFA) and 80% acetonitrile and incubated for 20 min with TiO<sub>2</sub> beads (10 µm particle size) (GL Science Inc., Tokyo, Japan) using a sample:TiO<sub>2</sub> ratio of 1:2. Prior to incubation, TiO<sub>2</sub> beads were pre-conditioned with a solution of 20 mg/mL 2,5-dihydrobenzoic acid (DHB) in 80% acetonitrile, 6% TFA, for 20 min. Then, beads were sequentially washed with 100 µL of 6% TFA and 10% acetonitrile, 100 µL of 6% TFA and 100 µL of 40% acetonitrile and 6% TFA and 60% acetonitrile. Finally, phosphopeptides were eluted first with 20 µL of 5% ammonium hydroxide and then with 20 µL 5% ammonium hydroxide in 10% acetonitrile in the same vial.

#### *Mass spectrometry*

LC-MS/MS was done by coupling a nanoLC-Ultra 1D+ system (Eksigent) to an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (ThermoFisher Scientific) *via* a Nanospray Flex source (ThermoFisher Scientific). Peptides were loaded into a trap column (NS-MP-10 BioSphere C18 5 µm, 20 mm length, Nanoseparations) for 10 min at a flow rate of 2.5 µl/min in 0.1% FA. Then, peptides were transferred to an analytical column (ReproSil Pur C18-AQ 1.9 µm, 400 mm length and 0.075 mm ID) and separated using a 129 min effective linear gradient (buffer A: 4% acetonitrile, 0.1% FA; buffer B: 100% acetonitrile, 0.1% FA) at a flow rate of 300 nL/min. The gradient used was: 0–2 min 6% B, 2–133 min 30% B, 133–133.5 min 98% B, 133.5–143.5 min 98% B and 143.5–150 min 2% B. The peptides were electrosprayed (1.4 kV) into the mass spectrometer with a PicoTip emitter (360/20 Tube OD/ID µm, tip ID 10 µm) (New Objective, Woburn MA, USA), a heated capillary temperature of 325°C and S-Lens RF level of 60%. The mass spectrometer was operated in a data-dependent mode, with an automatic switch between MS and MS/MS scans using a top 20 method (threshold signal ≥ 800 counts and dynamic exclusion of 45 sec). MS spectra (350-1500 m/z) were acquired in the Orbitrap with a resolution of 60,000 FWHM (400 m/z). Peptides were isolated using a 2 Th window and fragmented using collision induced dissociation with linear ion trap read out at a NCE of 38%

(0.25 Q-value and 10 ms activation time). The ion target values were 1E6 for MS (500 ms max injection time) and 5000 for MS/MS (100 ms max injection time).

#### *Data analysis*

Raw files were processed with MaxQuant (v 1.5.0.12) using the standard settings against a human protein database (UniProtKB/Swiss-Prot, December 2013, 20,584 sequences) supplemented with contaminants. Label-free quantification was done with match between runs (match window of 0.7 min and alignment window of 20 min). Carbamidomethylation of cysteines was set as a fixed modification whereas oxidation of methionines, protein N-term acetylation and phosphorylation of serines, threonines and tyrosines were set as variable modifications. Minimal peptide length was set to 7 amino acids and a maximum of two tryptic missed-cleavages were allowed. Results were filtered at 0.01 false discovery rate (peptide and protein level). Subsequently, the “phospho(STY)sites.txt” file was loaded in Perseus (v1.5.1.6) for further analysis.

#### **Extended histopathology and immunohistochemistry**

Paraffin embedding and sectioning of the different tissues (bone marrow clots, sternum, spleen, liver and urinary bladder) from patients with AML or mice were performed according to standard protocols. For phospho-ERK1/2 and human CD45 staining, formalin-fixed paraffin-embedded sections were deparaffinized and incubated overnight at 4°C with a phospho-ERK1/2 (ref. 4370) or CD45 (ref. 13917) antibody (both from Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), followed by signal detection with a peroxidase-conjugated secondary antibody (EnVision+ Dual Link, ref. K4063, Agilent, Santa Clara, CA, USA for phospho-ERK1/2 detection and anti-rabbit IgG, ref. 7074, Cell Signaling Technology for human CD45 detection) and the DAB substrate kit (ab94665, Abcam, Cambridge, UK). Slides were counterstained with Carazzi's hematoxylin solution (PanReac AppliChem, Ottoweg, Darmstadt, Germany) before mounting in DPX Mountant (Sigma-Aldrich). Slides images were taken with a digital camera connected to the 80i microscope, both from Nikon (Izasa S.A., Barcelona, Spain).

#### **Extended immunoblotting assays**

Cultured cells after treatment (200 nM of each treatment for 3 hours; or DMSO in control sample) or mononuclear cells were washed with ice-cold phosphate buffered saline (PBS) (Lonza, Basel, Switzerland) and pellets were collected. Cell pellets were treated with a cold

lysis buffer mixture (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, protease and phosphatase inhibitors, 100 U/ml DNase I, distilled H<sub>2</sub>O) for 30 minutes on ice and, subsequently centrifuged at 14000 × g for 5 minutes at 4°C. Supernatants were collected and stored at -80°C until analysis. Protein concentrations were determined using the Quick Start™ Bradford 1× Dye Reagent (Bio-Rad Laboratories), following the manufacturer's instructions, and read with the Epoch microplate reader running Gen5 software (both from BioTek, Winooski, VT, USA).

Whole cell lysates were separated by SDS-PAGE and then transferred to polyvinylidene difluoride Immun-Blot® membranes (Bio-Rad Laboratories). Proteins were detected after overnight incubation at 4°C with primary antibodies (see Supplementary Table 1). Antibodies against α-tubulin, GAPDH or ERK1/2, AKT, STAT5, MAPK14 and their phosphorylated forms were used. Then, secondary antibodies (see Supplementary Table 1) conjugated with horseradish peroxidase were incubated for 1 hour at room temperature. Bound antibodies were detected using the Prime Western Blotting Detection Reagent Amersham™ (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) and the ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories). Protein expression (densitometry analysis) was determined using ImageLab 5.0 software (Bio-Rad Laboratories) and corrected for housekeeping protein expression. Finally, expression levels were normalized to control samples and statistical analyses were performed.

### **Extended drug sensitivity assay**

Growth analyses were performed by seeding cells into 96-microwell plates at 2×10<sup>5</sup> cells/ml or 3×10<sup>5</sup> cells/ml (primary cells and MOLM-13 or OCI-AML3 cell lines, respectively). Cell viability after monotherapy and combination treatments (trametinib in combination with the three different TKIs) was determined after 48 hours or 72 hours (in cell lines or primary cells respectively) of exposure to drugs or DMSO alone using the Cell Counting Kit-8 reagent from Sigma-Aldrich, according to the manufacturer's protocol, and measured with the Epoch microplate reader running Gen5 software.

For monotherapy treatments *in vitro*, cell survival percentages from 3–6 independent experiments were calculated and normalized to controls. The half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values were determined according to a nonlinear program by GraphPad

Prism 5.01 (La Jolla, CA, USA) and dose-response graphics were represented as the mean survival  $\pm$  standard error of the mean (sem).

For combinational treatments *in vitro*, drug effects from 3 independent experiments were tested and the combination index (CI) was calculated. Normalized isobolograms were represented using CalcuSyn software (Biosoft, Great Shelford, Cambridge, UK).

For monotherapy and combination treatments *ex vivo*, the average percentage of blasts was around 70% in patients, so we can almost certainly exclude that the toxicity of the drug combination was due to the effects on other non-leukemic mononuclear cells. Bone marrow mononuclear cells were cultured in StemSpan™ SFEM medium (StemCell Technologies SARL, Grenoble, France) containing 20% FBS (ThermoFisher Scientific), Human Recombinant Stem Cell Factor (100 ng/ml) (StemCell Technologies), Human Recombinant Interleukin-3 (20 ng/ml) (StemCell Technologies), Human Interleukin-6 (20 ng/ml) (Miltenyi Biotec S.L., Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain), Human Recombinant FLT3-Ligand (100 ng/ml) (PeproTech EC Ltd., London, UK), and the corresponding drug therapies. Data were collected from 3 technical replicates for each patient and the applied analysis was the same as for the *in vitro* experiments.

### **Extended colony-forming unit assays**

To test for treatment-related toxicity, colony-forming assays in CD34+ control cells were performed. CD34+ cells were isolated from mononuclear cells with the MACs CD34 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec S.L.) according to the manufacturer's instructions. In total,  $2 \times 10^3$  CD34+ cells were resuspended in 200  $\mu$ l of IMDM medium (Biowest, Nuaille, France) supplemented with 20% FBS (ThermoFisher Scientific) and were then submerged into 3.8 ml of methylcellulose (Methocult Express 4437, StemCell Technologies) with different concentrations of the corresponding drugs (midostaurin, trametinib or their combination) or DMSO as control. Doses ranging from 2.5  $\mu$ M to 0.025  $\mu$ M were assayed for midostaurin in monotherapy, whereas trametinib monotherapy doses ranged from 5  $\mu$ M to 0.005  $\mu$ M. For combination treatment, doses of 0.25  $\mu$ M and 0.025  $\mu$ M of midostaurin were combined with doses of 5  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 0.05  $\mu$ M and 0.005  $\mu$ M of trametinib. Cells were plated in 35-mm Petri dishes in triplicates of 1.1 ml and incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Colony-forming units (CFU-granulocyte-monocyte and erythroid colonies) were

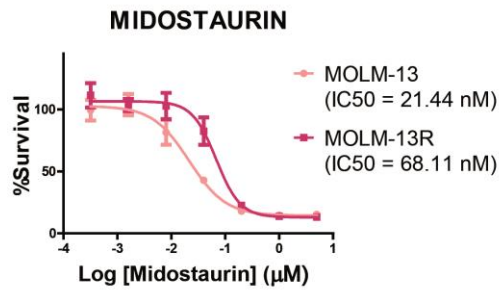
scored at day 13 using a stereomicroscope Olympus VMZ 1 x – 4 x (Olympus Iberia S.A.U., Barcelona, Spain).

### **Extended *in vivo* studies**

Female JAX™ NSG mice (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ) from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) were used at the age of 5–6 weeks. Standard rodent diet and water were available *ad libitum* throughout the study. Mice were housed seven per cage, each cage being a treatment group. Mice were injected with  $5 \times 10^6$  OCI-AML3 cells resuspended in PBS by tail injection. Three days after injection, mice were treated with vehicle (10% DMSO, n=7), trametinib (0.5 mg/kg, n=7), midostaurin (50 mg/kg, n=7) or the combination of both (trametinib and midostaurin at the same single doses, n=6) per day by intraperitoneal injection during 14 days. Mice were monitored and sacrificed when AML symptoms or humane endpoint appeared (10% weight loss, kyphosis, paralysis, pain parameters, etc.) during the period of 57 days of the experiment. At necropsy, spleen and liver were weighed, and organs of interest were collected and embedded in paraffin blocks for further studies. All experiments involving animals were conducted at the Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) in accordance with National and International Guidelines for Animal Care. The study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Comunidad de Madrid on April 18th 2017.

## SUPPLEMENTARY FIGURES

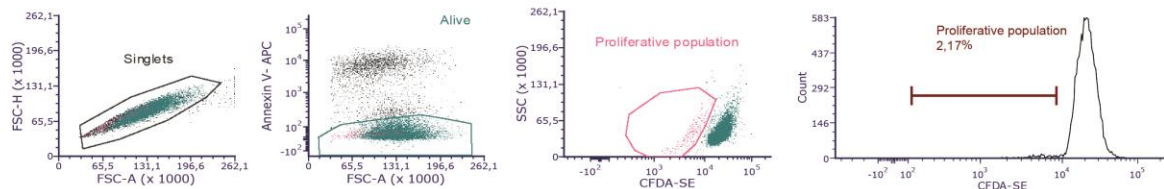
Supplementary Figure S1



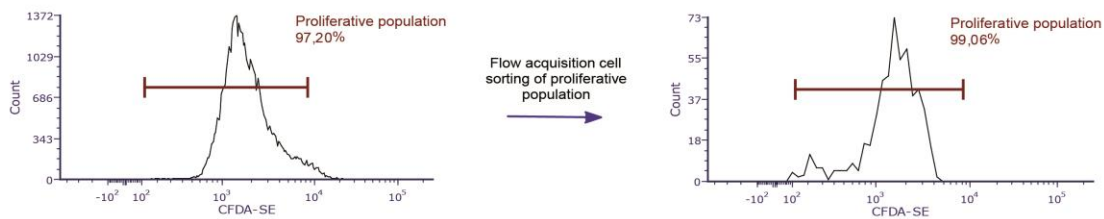
**Supplementary Figure S1. IC<sub>50</sub> dose-response to midostaurin in MOLM-13 and MOLM-13R.** IC<sub>50</sub> dose-response to midostaurin of sensitive or resistant MOLM-13 cultures (MOLM-13 and MOLM-13R, respectively).

Supplementary Figure S2

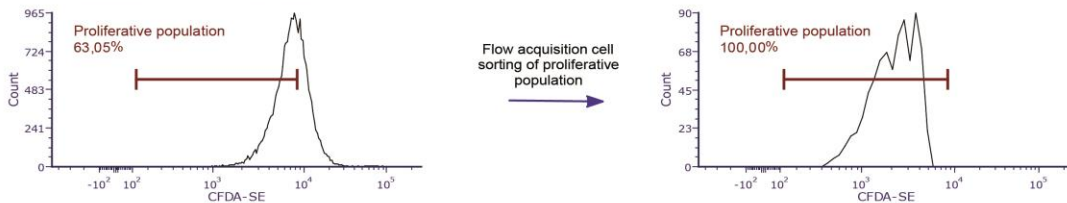
Gating and analysis strategy (based on 24h CFDA incubation non-treated culture)



48h CFDA incubation, non-treated culture



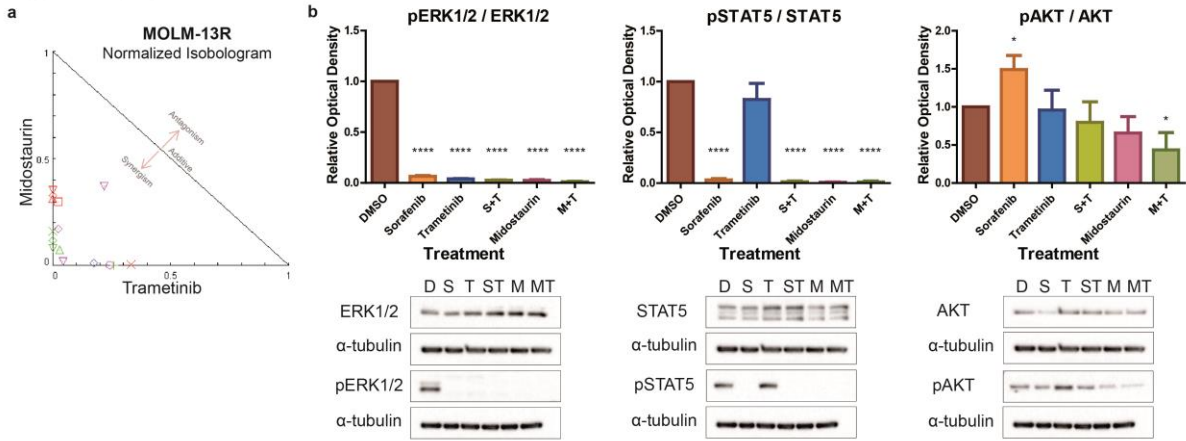
48h CFDA incubation, Sorafenib-treated culture



**Supplementary Figure S2. Representative charts/plots from flow acquisition cell sorting.**

Gating strategy was based on singlets and dead cells exclusion. When possible, a minimum of 10000 cells from the population of interest were analyzed.

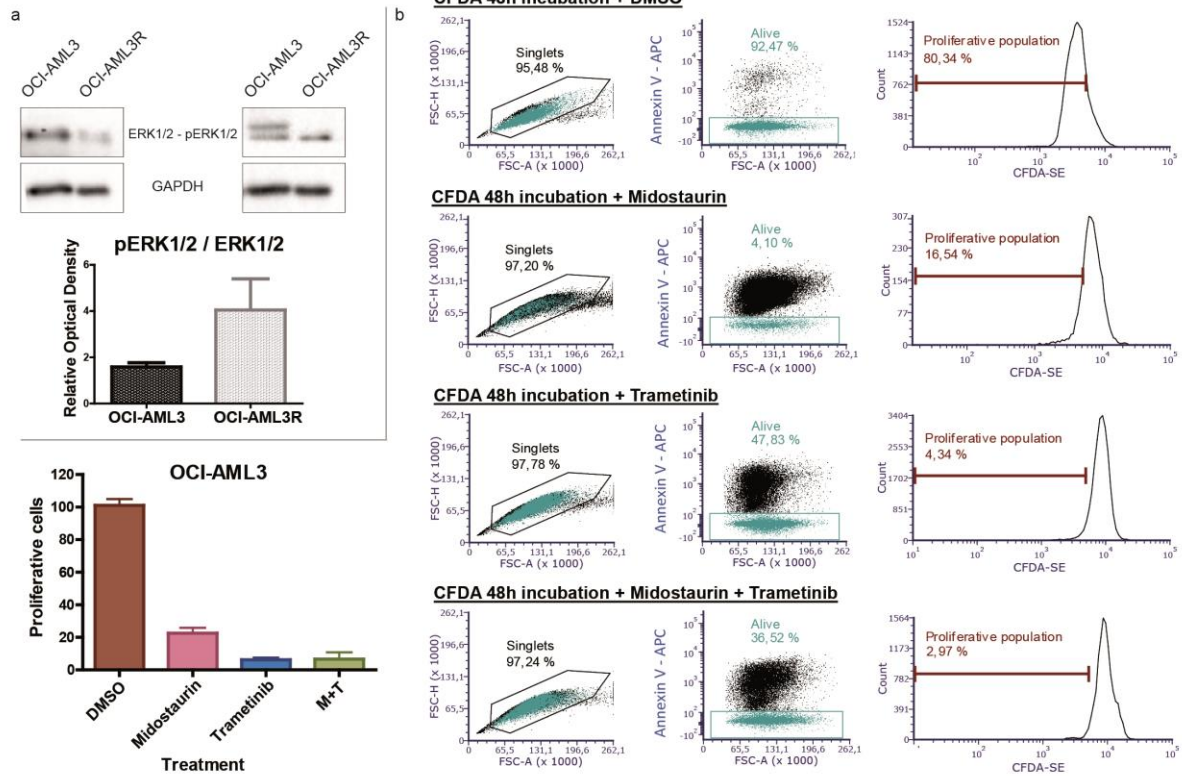
Supplementary Figure S3



**Supplementary Figure S3. The combination of midostaurin plus trametinib is synergistic and effective in MOLM-13R.**

(a) Normalized isobologram for midostaurin plus trametinib combination in MOLM-13R. (b) The levels of ERK1/2, STAT5, and AKT and their phosphorylated forms were analyzed by western blotting in TKI-resistant MOLM-13R cultures after monotherapy or combined drug treatments (200 nM of each treatment for 3 hours). Representative blots of three independent experiments, yielding equivalent results, are shown. \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ .

Supplementary Figure S4



**Supplementary Figure S4. Midostaurin plus trametinib is beneficial in the context of TKI resistance in *FLT3* wildtype.**

(a) pERK/ERK protein levels measured by western blotting in sensitive and resistant OCI-AML3 cultures. The intensity of each band was normalized to the corresponding GAPDH value. (b) Representative charts/plots for experiments of proliferative and viable OCI-AML3 cells after midostaurin, trametinib or their combination. Gating strategy was based on singlets and dead cells exclusion. When possible, a minimum of 10000 cells from the population of interest were analyzed.

## SUPPLEMENTARY TABLES

**Supplementary Table 1. Antibodies information.**

<i>Name</i>	<i>Reference</i>	<i>Company</i>	<i>Dilution</i>
<b>Primary antibodies</b>			
P44/42 MAPK (Erk1/2)	#4695	Cell Signalling TECHNOLOGY	1/1000
Phospho-p44/42 (Erk1/2)	#9106	Cell Signalling TECHNOLOGY	1/2000
Stat5	#9363	Cell Signalling TECHNOLOGY	1/1000
Phospho-Stat5	#9359	Cell Signalling TECHNOLOGY	1/100
Akt	#4691	Cell Signalling TECHNOLOGY	1/1000
Phospho-Akt	#4060	Cell Signalling TECHNOLOGY	1/2000
p38 MAPK	#9212	Cell Signalling TECHNOLOGY	1/1000
Phospho-p38 MAPK	#9215	Cell Signalling TECHNOLOGY	1/1000
Anti- $\alpha$ -Tubulin	AB7291	Abcam	1/10000
Anti-GAPDH	AM4300	Ambion / Invitrogen	1/10000
<b>Secondary Antibodies</b>			
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	#7074	Cell Signalling TECHNOLOGY	1/2000
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	#7076	Cell Signalling TECHNOLOGY	1/10000





