

## EFICACIA IN VITRO E IN VIVO DE APO010, UNA FORMA RECOMBINANTE DE FAS-LIGANDO, EN EL TRATAMIENTO DEL MIELOMA MÚLTIPLE

Ocio EM<sup>1,2</sup>, Maiso P<sup>1</sup>, Garayoa M<sup>1</sup>, Dupuis M<sup>3</sup>, Pandiella A<sup>1</sup>, San Miguel JF<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigación del Cáncer. CSIC/Universidad de Salamanca. <sup>2</sup>Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. <sup>3</sup>Apoxis S.A. Lausanne, Switzerland

**Introducción y objetivos:** El importante efecto apoptótico inducido por los receptores de muerte, hace que sus ligandos representen una atractiva diana antitumoral. APO010 es una forma recombinante de Fas-Ligando cuyo efecto en tumores hematológicos es aún desconocido. En este estudio se ha analizado la eficacia *in vitro* e *in vivo* de APO010 frente al mieloma múltiple (MM).

**Material y Métodos:** La eficacia *in vitro* se analizó en 8 líneas celulares (LC) de MM, sensibles (MM1S, U266, RPMI-8226, MM144 y OPM-1) y resistentes (MM1R, RPMI-LR5, RPMI-Dox40) a fármacos convencionales. Para analizar el efecto citotóxico y antiproliferativo de APO010 se utilizaron técnicas de MTT, de Anexina V, de incorporación de BrdU y de captación de yoduro de propidio y para profundizar en el mecanismo de acción, estudios de Western-Blot y de Microarrays. Los estudios *in vivo* se realizaron en un modelo de plasmocitoma humano en ratón CB17-SCID. Los ratones recibieron APO010 15 µg/Kg ip x 5d/sem (n=7), APO010 5 µg/Kg ip x 5d/sem (n=8) o vehículo (n=8).

**Resultados:** De las 8 LC testadas, 6 fueron muy sensibles, con CI50 a las 24h de 0.5-20 ng/ml (2.5-100 pM), mientras que las 2 restantes fueron resistentes a APO010 (RPMI-8226 y OPM-1). Se observó una clara correlación entre la sensibilidad de las células a APO010 y la expresión de Fas en su superficie. APO010 no presentó toxicidad significativa en células mononucleares de sangre periférica de 3 donantes a dosis eficaces en LC. APO010 es capaz de vencer la ventaja proliferativa conferida por el co-cultivo con IL-6, IGF-1 o células mesenquimales de médula ósea. La combinación de APO010 con Doxorubicina y Bortezomib y, en menor medida, con Lenalidomida y Melfalán induce un efecto sinérgico antitumoral.

La apoptosis es la principal vía de actuación de APO010. En este sentido, APO010 induce un rápido procesamiento de PARP y de las caspasas-3, 7, 8 y 9 (tras 2h); sin embargo, únicamente los inhibidores de caspasa-3 y de caspasa-8 (Z-VAD-FMK y Z-IETD-FMK), pero no el inhibidor de caspasa-9 (Z-LEHD-FMK), son capaces de bloquear la muerte inducida por APO010. Este fármaco también provoca un procesamiento de la proteína antiapoptótica MCL-1 y la activación de BID. Respecto a otras rutas, APO010 disminuye los niveles de las proteínas proliferativas pAKT y pERK. En los estudios del perfil de expresión génica, APO010 induce la deregulación de 71 genes, mayoritariamente implicados en transducción de señales y regulación de la transcripción.

En los estudios *in vivo*, APO010 fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral en los ratones tratados en comparación con los controles (p=0.02), sin diferencias entre los dos grupos de tratamiento. Además, mostró un perfil de seguridad muy aceptable.

**Conclusiones:** APO010 presenta una potente eficacia antimieloma tanto en un modelo *in vitro* como *in vivo*, con un perfil de toxicidad adecuado. Estos estudios, proporcionan el fundamento para el uso de este agente en combinación con otros fármacos en el tratamiento del MM.