

PROYECTO FUNDACIÓN MARÍA GARCÍA ESTRADA

Título del proyecto: Estudio de los inhibidores de PARP como tratamiento en el Sarcoma de Ewing: estudio preclínico.

Dr. Enrique de Álava.

Laboratorio de Patología Molecular de Sarcomas (Lab-PMS)

Centro de Investigación del Cáncer (CIC). Salamanca

RESUMEN

1. Introducción

En el sarcoma de Ewing (SE), un tumor que afecta principalmente a niños y adolescentes, la esperanza de vida con los regímenes terapéuticos actuales es muy corta en pacientes que presentan recaída o metástasis. Estos tumores presentan fusiones génicas EWS-ETS en el 100% de los casos. Mediante Hibridación Genómica Comparativa en soporte microarray (aCGH), en el grupo de Patología Molecular de sarcomas del CIC identificamos cómo los pacientes de SE con peor supervivencia presentaban tumores que se caracterizaban por la presencia de ganancias de 1q (1qG). Los perfiles transcripcionales de los tumores 1qG estudiados mostraron una sobreexpresión del gen PARP1 que desempeña un papel clave en los mecanismos de reparación del ADN entre otras funciones (Mackintosh, Ordóñez et al. 2012 oncogene); (Mackintosh, Ordóñez et al. patent 2010). En fechas recientes se ha demostrado que PARP1 juega un papel clave en el perfil transcripcional de otros tumores que también poseen fusiones ETS y de manera relevante en el SE.

El objetivo de este proyecto es estudiar el valor de PARP1 como diana terapéutica en SE. Para ello estamos llevando a cabo estudios funcionales *in vitro e in vivo* y en muestras tumorales de pacientes para determinar la relevancia de la expresión de PARP1 en SE. Además estamos evaluando la eficacia de la aplicación de los inhibidores de PARP (PARPinh) tanto en monoterapia como mediante el uso conjunto con otros fármacos: agentes que provocan daños en el DNA (Yondelis); con inhibidores del proteasoma-ubiquitinización (Bortezomib, MLN4924); inhibidores específicos de HSP90 (17-AAG); y con otros fármacos quimioterápicos actualmente en uso en el tratamiento de los pacientes de SE (Vincristina, Doxorubicina, Ifosfamida, ácido zoledrónico). Interesantemente el ácido zoledrónico tiene como diana la proteína centromérica CenpF, una proteína que está asociada con el complejo centrómero/cinetocoro y cuyo gen se encuentra localizado en la región 1q.

1. Actividades realizadas y objetivos alcanzados.

Se realizó un estudio farmacológico, testando el efecto antiproliferativo de la aplicación de tres diferentes fármacos inhibidores de PARP1 y PARP2 que están actualmente en estudios clínicos como (ABT-888 (Veliparib), AZD2281 (Olaparib), BSI-201 (Iniparib) [7]) en 14 líneas celulares de SE y una línea de rhabdomyosarcoma (SJRH). Las líneas de SE a las 72 horas de tratamiento mostraron una sensibilidad mucho mayor a la acción del Olaparib que a cualquiera de los otros dos fármacos (Veliparib e, Iniparib). Se obtuvieron unos valores de inhibición de la proliferación (IC50) en el rango del nanomolar alto y micromolar alto (Fig.1).

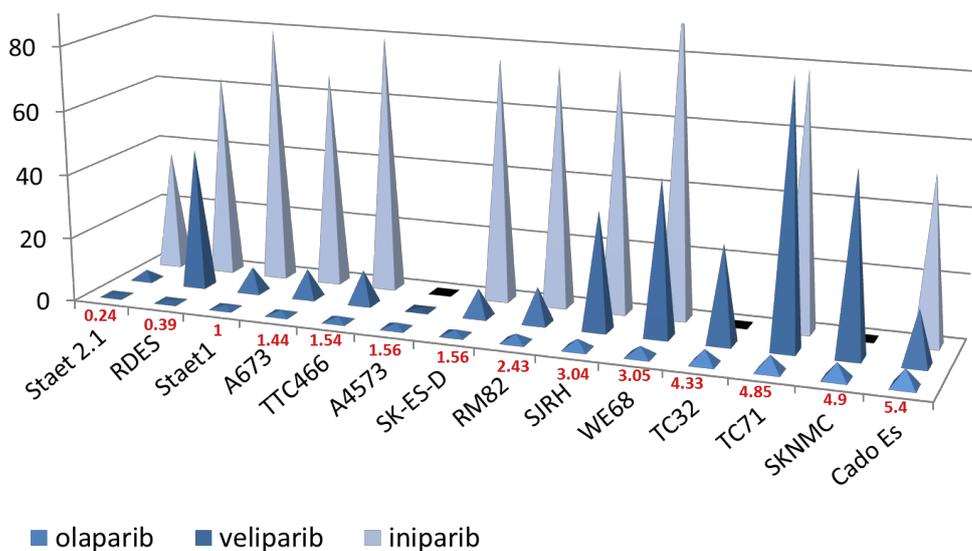


Figura1. Índice de proliferación (IC50) de las líneas celulares a las 72 horas de tratamiento. Todas las líneas fueron más sensibles al Olaparib que a los otros dos PARPih (Veliparib e iniparib)

Consecuentemente, seleccionamos el fármaco Olaparib para realizar los **estudios en combinación:**

Yondelis (Trabectedina) es un compuesto antitumoral de origen marino que se encuentra actualmente en ensayos clínicos. Este compuesto, se une al surco menor del DNA interfiriendo con los procesos de transcripción y reparación del DNA y bloqueando el ciclo celular entre otras funciones. Nosotros comprobamos que las líneas de SE son muy sensibles a la acción de Yondelis con valores de IC50 en el rango del nanomolar bajo (26,51-99,9 pM). Estas líneas experimentan apoptosis/necrosis, en un porcentaje del 40% en el caso de la línea SK-N-MC. Yondelis provoca un parón a nivel de la fase S y G2/M. La aplicación simultánea de Olaparib vs Yondelis (Trabectedina) produce un efecto sinérgico en la mayoría de las líneas celulares estudiadas (Índice de combinación <1) (Figura 2).

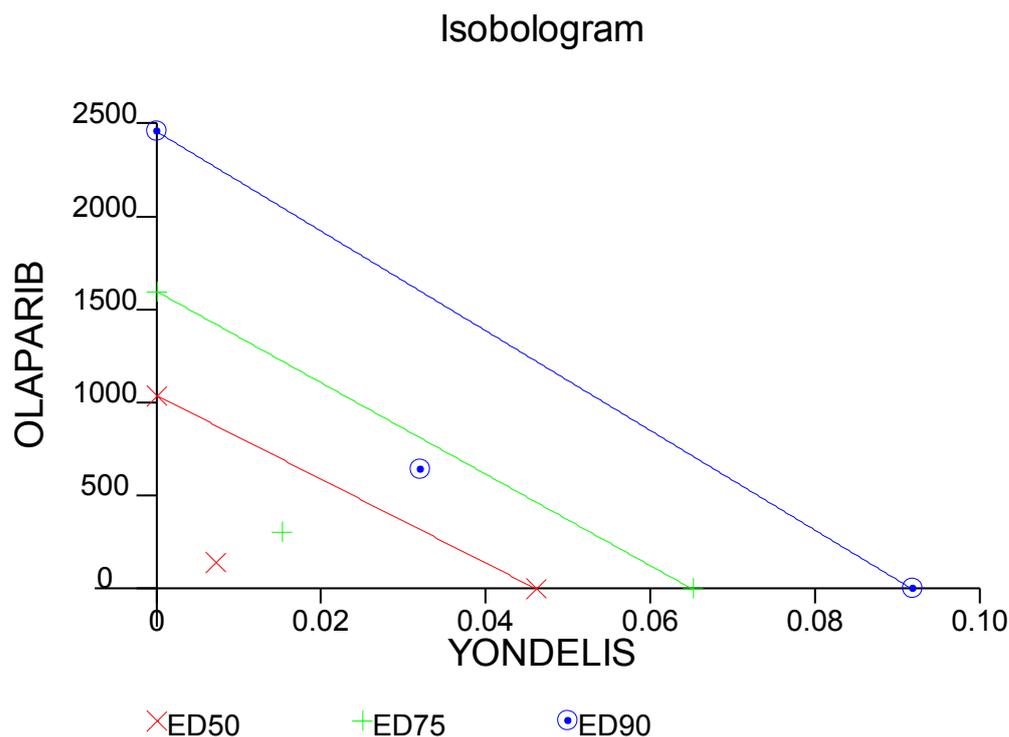


Fig 2. Sinergismo observado en la línea celular de sarcoma de Ewing SK-N-MC cuando se aplica la combinación de Olaparib vs Yondelis.

Linsitinib. Este fármaco es un inhibidor dual de IGF1-R y del receptor de Insulina (IR). Linsitinib induce un parón del ciclo celular en G0/G1 y apoptosis/necrosis alrededor del 25% (línea SK-N-MC). La combinación Olaparib + Linsitinib indujo un efecto sinérgico en alguna de las líneas estudiadas (STAET 2.1 IC= 0.64).

Ácido zoledrónico. Es un bisfosfonato que actúa como un potente inhibidor de la reabsorción de hueso y que es habitualmente utilizado en el tratamiento del cáncer para tratar las lesiones óseas inducidas por los tumores sólidos y el mieloma múltiple. Recientemente se ha señalado que este fármaco tiene como una de sus dianas la proteína centromérica CenpF/mitosin, una proteína que está asociada con el complejo centrómero/cinetocoro y que está involucrada en la correcta separación de los cromosomas durante la mitosis y cuyo gen se encuentra localizado en la región 1q. Los valores de IC50 para las 15 líneas estudiadas están en el rango del uM bajo. Actualmente estamos llevando a cabo los experimentos de combinación del olaparib en combinación con ácido zoledrónico.

Además comprobamos mediante western Blott la expresión de PARP1 en todas las líneas celulares estudiadas así como la expresión de otros componentes de los mecanismos de reparación del DNA (Fig 3).

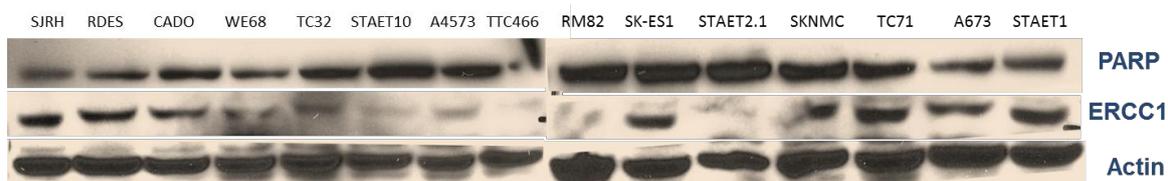


Fig 3. Expresión proteica de PARP1 y ERCC1 en las líneas celulares estudiadas.

En la actualidad estamos analizando los datos de expresión proteica de los componentes de reparación del DNA así como realizando nuevos estudios con arrays de baja densidad para comprobar el cambio en los niveles de expresión de los componentes de los mecanismos de reparación tras la aplicación de los fármacos

2. Actividades previstas a realizar en el presente año 2013.

En el año entrante tenemos previsto completar los estudios de combinación de fármacos *in vitro* y comenzar con los estudios *in vivo* de combinación de los fármacos inhibidores de PARP. Los datos aportados en esta memoria en lo referente a la combinación de inhibidores de PARP vs Yondelis fueron presentados a miembros de la empresa PharmaMar, propietaria del fármaco Yondelis, en fechas recientes. A principios del mes de abril tenemos previsto firmar un acuerdo de confidencialidad (MTA) con la empresa PharmaMar para iniciar los estudios *in vivo* de la combinación farmacológica de ambos fármacos, previsiblemente a mediados finales del mes de abril.

3. Publicaciones como consecuencia de la acción.

En todas las publicaciones y presentaciones a congresos que se relacionan a continuación se menciona la Fundación Solórzano como fuente de financiación.

Ordóñez JL, Osuna D, Madoz-Gúrpide J, de Álava E. Molecular pathology of bone and soft tissue tumors. The molecular Basis of Human Cancer. Editors: Coleman WB and Tsongalis GJ. Human Press, 2ª edición. (2013 in Press).

J. L. Ordóñez, A. T. Amaral, M. V. Sevillano, D.J. Dominguez, M. Aracil, C. M. Galmarini, E. de Álava. *In vitro* study of Yondelis in combination with PARP inhibitors in Ewing Sarcoma. Pediatric Cancer Research at the INTERFACE. Submitted al congreso a celebrar en Viena 6-9 junio de 2013