



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Inmunoterapia dirigida: estudio preclínico de la eficacia anti-tumoral de CAR-T y CAR-CB-NK para el tratamiento de neoplasias hematológicas de célula B madura

Lorena Pérez Amill

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.





Programa de Doctorat en Biomedicina

Línia d'investigació en immunologia

2016-2020



**Inmunoterapia dirigida: estudio preclínico de la eficacia anti-tumoral de CAR-T y CAR-CB-NK para el tratamiento de neoplasias hematológicas de célula B madura.**

Tesis doctoral presentada per:

Lorena Pérez Amill

Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

Departament Hematologia- Oncologia

Doctorand

Co-directors

Tutor

Lorena  
Pérez Amill

Dr. Álvaro  
Urbano Ispizua

Dra. Beatriz  
Martín Antonio

Dr. Francisco  
Lozano Soto



Als meus pares, Vicente i Dolors,  
al meu germà David  
i a tu Roger.

I am among those who think that science has great beauty.

Marie Curie



## Agradecimientos

Estos agradecimientos están escritos en días de confinamiento debido a la Covid-19, aviso por si son un poco más largos o sentimentales de lo esperado, o tal vez, solo son excusas para que no me los tengáis en cuenta, sea lo que sea, querría escribir estas páginas a todas esas personas que de una manera u otra han estado aquí, conmigo, durante estos años de tesis.

Para empezar, quiero dar las gracias a Álvaro por ser mi director de tesis durante estos años, por darme la oportunidad de hacer una tesis en inmunoterapia. Por dejarse convencer por Bea y permitirme estar 5 largos años trabajando en lo que tanto me gusta. Segundo, a mi directora de tesis, la que siempre ha estado allí, Bea, han sido muchos años juntas, pero si algo tengo claro, después de tanto tiempo, trabajo y esfuerzo compartido en esta tesis es que ninguna de las dos olvidará esta etapa, gracias por todos los consejos y confianza depositada en mí. Y por último a mi tutor de tesis Paco Lozano por ayudarnos cuando fue necesario.

A lo largo de estos años he conocido y coincidido con mucha gente, pero estoy segura que nada sería lo mismo sin los que yo llamo “mis papis” de la tesis. Aún me cuesta entender que se fueran antes que yo... va sobre todo por vosotros Guillermo, Tania y Maria. Guillermo, no sé qué hubiera hecho en mis comienzos en el “lab” sin ti, me enseñaste el mundo del *cloning*, de los ratoncitos. Pero sobre todo me enseñaste sobre la vida, estoy segura de que tus alumnos están muy contentos con el profesor que les ha tocado, gracias. Tania, mi “mami”, que sabias si algo andaba mal solo con mirarme y sabias quitar “hierro” al asunto. Gracias por tu vitalidad tan necesaria en un laboratorio, me alegra saber que sigues allí, al otro lado, en la facultad siempre que necesite un café de ánimos. Maria, vas arribar una mica més tard, quasi per sorpresa, però ràpidament et vas fes estimar, moltes gràcies per tots els consells tant professionals com sobre la vida donats durant aquests anys, per ajudar-me sempre que ho he necessitat, per posar una mica de sentit comú en aquest món boig que és la ciència.

A la gente del “lab” que han estado allí siempre, Ester aunque también te vas, tu si has escogido el mejor momento, irte justo antes que yo para no perderte ninguna de mis aventuras “de niña” durante mi tesis. Creo que son muchos, muchos momentos y cafés compartidos, con muchas reflexiones de por medio, gracias por todo ello, te deseo lo mejor en tu nueva etapa, un gran cambio a tu edad...Mi consejo como siempre es ir con una gran sonrisa, aunque seguro que te va super bien, te mereces más que nadie ser profe de inmuno. M.Pau viniste, te fuiste y volviste, ahora me toca a mí irme, espero que lo entiendas, pero antes quería darte las gracias por ser tan

buena persona. Alfredo, dr. Rivas, nuestro médico personal, te incorporaste tarde pero qué gran incorporación, muchas gracias por todos los pasteles, cruasanes de chocolate, bombones, en general gracias por endulzarme la vida en todos los aspectos. Mucha suerte en tu nueva aventura, espero volver a coincidir contigo.

Asier, otro que se fue, lentamente como todo lo que hace...apareciste un día sin avisar, nervioso, raro porqué luego al conocerte eres la tranquilidad echa persona. Poco a poco te fuiste ganando a todo el mundo, en total han sido prácticamente dos años juntos aprendiendo de ciencia y restaurantes. Gracias por todas las tardes/noches de compañía en el "lab", por todos los momentos compartidos, algún día descubrirás algo importante y podré decir que te enseñe a plaquear! Sheila, en verdad, no llego al año juntas, pero ¡qué año! Fue bastante intensito, pero juntas nos hicimos más fuertes, gracias por todos los consejos sobre la vida en la cabina de cultivos y todas las tonterías compartidas. Y después de una pelirroja, llego la de verdad, Iris gracias por ser única, por enseñarnos más de comida y ayudarnos en lo necesario.

A todas esas personas que en algún momento pasaron por el laboratorio como Valeria, la médica más positiva que he conocido, me encanta tu vitalidad, es contagiosa. A Cristina, la chica que había hecho de todo a sus 20 y pocos, gracias por ese verano. A Gerardo por su interés en aprender antes de irse a empezar su aventura en Alemania, suerte con la vuelta. Meriem the girl that works more during her Erasmus, for sure, I hope you will remember this experience as something good in your live even with coronavirus around, I will always remember your face that Saturday in the cell culture. Mariaje, gracias por estar allí en estos últimos momentos, espero que disfrutes de este verano tan merecido tras estas intensas prácticas de máster. Anthony, you were the last one who take the appreciated chair next to me, thank you, for these sharing moments in the last months and good luck with your project.

No em podia oblidar de vosaltres, que vau fer que el final fos menys difícil de l'esperat. Moltes gràcies a les LabQueens, Mireia i Aina, perquè heu sigut les forces que m'han fet falta en aquesta última etapa del doctorat, gràcies per tots els consells, cafès amb xocolata (85% of course) compartits, per ajudar-me a encarar la vida de la millor manera, sense oblidar el que és realment important, gràcies.

Berta vam començar aquesta tesis juntes, tu al CELLEX i jo al CEX, però el destí va voler que acabéssim sent veïnes. Moltes experiències viscudes juntes, molts riures i també plors compartits, però res que una cervesa no pogués curar, moltes gràcies per després de tot seguir aquí. Espero veure't aviat convertint-te en doctora també.

Maria Velasco, la chica de inmuno que me adoptó en la planta 1, gracias a ti y tu grupo (con permiso de Paco) Cristina y Sergi por ayudarme en cualquier momento y todas las cervezas y abrazos tan necesarios, gracias.

Al grup del costat, Hugo, Paula, Irene i Sonia, gràcies per tots els moments compartits. Hugo i el seu humor anglès tant ocurrent, que sempre complia amb la missió de fer-te riure o almenys restar-li importància al mal de cap d'aquell dia, gràcies també pels consells gratis sobre experiments i de la vida. Paula, espero algun dia veure't amb el jersei XXL, i sobretot que deixis el llistó de biomedes ben a dalt, n'estic segura. Irene, es difícil trobar a persones tan bones com tu, gracias per preocupar-te sempre per mi i preguntar-me en qualsevol moment com anava l'experiment, l'escriptura, s'agraeixen molt les bones paraules en els moments difícils. Sonia i els seus labmeetings de CARs, hem après molt de tots en aquestes reunions.

También me gustaría nombrar a toda la gente de la planta que en algún momento hemos compartidos cultivos, pasillos u office, gracias a todos por alegrarme un poquito el día a día, a las Martas y Patri, a los bioinformáticos, a las técnicas de detrás, sobre todo a Cristina. A los de grupo de Patri, por su experiencia en macrófagos y ratones, sobre todo gracias a Patri, Neus, Juan, Fabian y Martina. A los del grupo de Fillat, Estela y Giulia, a Sabrina, Silvia, Ana y Marc. Sin olvidar de las labmanager que nos intentar hacer la vida más fácil, a Marta y luego Gemma, siempre teniendo a Pepa i Cristina Canaleta para soluciones de última hora.

Por último, me gustaría dar las gracias a toda la gente del Hospital, en especial a Manel por su aprecio y apoyo des de la distancia, dando consejos profesionales como personales. A les Annes del CELLEX i el Sergi pels moments compartits, a Valentín ese médico capaz de todo para que el ensayo clínico salga bien. Al personal de plataformas como microscopia confocal, estabulario en especial a Lara, Pep y Laia, a la Cristina per estar disposada sempre a irradiar cèl·lules o ratolins i tenir paciència amb nosaltres i els nostres formularis. Y en general a toda la gente del Hospital Clínic que ha colaborado de alguna forma a que todo salga bien, como M<sup>a</sup>José o Vanesa.

Una tesis no és únicament feina, ni tampoc inclou sols a les persones amb les que treballes a diari, ja que durant aquesta etapa de la teva vida tot gira en part al voltant de la tesis. Per això, també m'agradaria donar les gràcies a totes aquestes altres persones sempre presents en la meva vida que també ho han estat durant aquests anys.

Vull donar les gràcies especialment a les meves amigues de la uni, al WIII, perquè en part amb elles vaig començar aquesta aventura de la ciència fa més de 8 anys. Sense

elles, no crec que hagués aconseguit ni ser graduada així que molt menys doctora. Com sempre la Maria m'ha deixat el llistó molt alt, espero estar a l'alçada. Maria serà la primera en ser doctora, com ha de ser, perquè quan penso en una persona investigadora crec que tu ets el reflex d'interès i sacrifici per la ciència a parts iguals. Nat, siempre allí ofreciendo calma en tiempos revueltos y compartiendo tu visión bonita y entusiasta de la vida. Elena empecé mi doctorado compartiendo piso contigo, un año que jamás olvidaré, y que creo, nos unió todavía más. Aida esa persona calmada con quién puedes contar para que te dé un buen consejo. Ana una de les persones amb més vitalitat que conec, tan petitona però a la vegada amb tantes ganes de tot, gràcies per tots els teus àtacs de riure o crits que fan més maco el dia a dia. Mis chicas alemanas, Bea porque, aunque estés lejos, tus audios siempre, siempre son bienvenidos. Por último, Carmencita te veo mucho menos de lo que querría, pero los momentos juntas valen la pena, de momento, sobrevivimos a todos ellos. En definitiva, chicas, gracias por todo, nunca pensé que tendría tanta suerte encontrando este grupito en la uni.

Segueixo amb les meves amigues de sempre, perquè les cinc juntes som capaces de tot. Núria no tinc cap dubte que sempre podré comptar amb tu pel que faci falta, saber que en qualsevol repte, alegria, camí que ens depari la vida et tindré, és una gran tranquil·litat. Laura Beumala mai oblidaré tots els caps de setmana tancades a la biblioteca, estudiant i parlant de la vida, crec que som molt diferents, però a la vegada no sé que faria sense tu. Marina de les més complicades, amb permís de la Beumi, tens la capacitat de parlar durant hores però també d'escoltar i estar quan és necessari amb un bon consell, gràcies per ser com ets. Laura Mateo la més alegre del grup, la que sempre sap treure un somriure, gràcies per animar-me sempre, la teva energia, sí, sí energia sé que t'agradarà aquesta paraula venint de mi, és contagiosa.

Por último, quiero dar las gracias a toda mi familia. Sobre todo, a mis padres que siempre han creído en mí y han estado apoyándome en cada paso que he dado. Al meu germà David perquè sempre serà el meu germanet amb el que fer broma de qualsevol cosa i riure'ns d'allò que sols en fa gracia a nosaltres. A la meva tieta Montse perquè les seves abraçades curen tots els mals. Als avis que ja no estan, però que sé com de contents i orgullosos estarien avui. A la meva yaya Basi y yayo Vicente por cuidar de mi y quererme tanto. También quiero agradecer a mis tíos y primos que, aunque nos vemos poco sé que siempre estarán allí, al igual que mis padrinos, ejemplo de valentía y superación año tras año y las ganas de seguir "pa'lante". A la Montse, el Jordi i el Ricard que em van acollir com una més des del principi i sempre s'han preocupat per mi.

Roger, ets l'últim perquè sense tu no sé com hagués sobreviscut aquests quatre anys, has sigut el braç on recolzar-me a diari, m'has fet veure totes les coses positives quan eren moments difícils, inclús has rigut amb mi ens els moments de desesperació, en definitiva, la meva calma constant. Però, sobretot has tingut la paciència de seguir al meu costat aquests quatre anys amb moltes hores de treball i poques per estar junts, gràcies per tot. Inclús, em vas fer el millor regal de tots, amb l'objectiu de que arribés abans a casa, el Freddie! Gràcies, gatito per tots els teus ronroneos i companyia durant el confinament mentre escrivia aquesta tesis.



# Índice

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>7</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>18</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>20</b>
<b>1. Neoplasia hematológica</b> .....	<b>22</b>
1.1. DIFERENCIACIÓN DE LA CÉLULA B.....	23
1.2. MIELOMA MÚLTIPLE (MM) .....	25
1.3. PATOGÉNESIS .....	25
1.3.1. <i>Microambiente tumoral</i> .....	27
1.3.2. <i>Diagnóstico</i> .....	28
1.3.3. <i>Tratamiento</i> .....	30
1.4. LINFOMA NO HODGKIN (LNH) .....	33
1.4.1. <i>Diagnóstico</i> .....	34
1.4.2. <i>Linfoma difuso de célula B grande (DLBCL)</i> .....	34
<i>Patogénesis</i> .....	35
<i>Tratamiento</i> .....	35
<i>Patogénesis</i> .....	38
<i>Tratamiento</i> .....	38
<b>2. Respuesta inmunitaria</b> .....	<b>39</b>
<b>3. Inmunoterapia</b> .....	<b>40</b>
3.1. INMUNOTERAPIA CELULAR ADOPTIVA .....	43
3.2. TERAPIA CAR (CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR) .....	44
3.2.1. <i>Estructura de un CAR</i> .....	45
3.2.2. <i>Generaciones de CARs</i> .....	46
3.2.3. <i>Limitaciones y toxicidades de la terapia CAR</i> .....	48
3.3. CAR-T.....	51
3.3.1. <i>CAR-T en enfermedades hematológicas</i> .....	52
3.3.1.1. <i>CAR-T en Mieloma múltiple</i> .....	53
3.1.1.2. <i>CAR-T en Linfoma</i> .....	57
3.2. CAR-NK .....	58
3.2.1. <i>Célula Natural killer (NK)</i> .....	58
3.2.2. <i>Citotoxicidad</i> .....	59
3.2.3. <i>CAR-NK</i> .....	62
<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	<b>68</b>
<b>Material y métodos</b> .....	<b>72</b>
1. LÍNEAS CELULARES .....	74
2. CLONAJES .....	74

3.	PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA) .....	75
4.	PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA PARA LA ELECTROFORESIS .....	75
5.	DIGESTIÓN Y LIGACIÓN DE VECTORES .....	76
6.	TRANSFORMACIÓN EN BACTERIA.....	77
7.	PRODUCCIÓN VIRAL.....	77
8.	TITULACIÓN DEL VIRUS.....	79
9.	OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE CÉLULAS CAR-T .....	80
10.	DETECCIÓN DE CÉLULAS CART .....	81
11.	OBTENCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS .....	82
12.	OBTENCIÓN Y EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS NK DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL (CB-NK) .....	82
13.	ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN .....	83
14.	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.....	83
15.	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CONSECUTIVOS .....	84
16.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES .....	84
17.	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CON FUENTE CONTINUA DE BCMA SOLUBLE.....	84
18.	MICROSCOPIA CONFOCAL .....	85
19.	IMÁGENES EN LAPSO DE TIEMPO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA.....	86
20.	ENSAYOS <i>IN VIVO</i> .....	86
21.	PROCESAMIENTO Y MARCAJE DE POBLACIONES CELULARES DE TEJIDOS .....	87
22.	PROCESAMIENTO Y MARCAJE DE CÉLULAS EN SANGRE .....	87
23.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	88
<b>Resultados.....</b>		<b>90</b>
1.	DISEÑO DE UN CART-ANTI <sup>BCMA</sup> MURINO (ARI2M) PARA EL TRATAMIENTO DEL MM EN UNA INSTITUCIÓN PÚBLICA. ....	92
1.1.	LAS CÉLULAS ARI2M PRESENTAN UNA ALTA ACTIVIDAD ANTI-MM <i>IN VITRO</i> .....	93
1.2.	LOS LINFOCITOS ARI2M DEMUESTRAN UNA ALTA ACTIVIDAD ANTI-MM <i>IN VIVO</i> .....	94
2.	HUMANIZACIÓN DE ARI2M Y COMPARATIVA DE LA ACTIVIDAD Y EFICACIA DEL ARI2 MURINO Y SU VERSIÓN HUMANIZADA. ....	97
2.1.	EFICACIA ANTI-MM DE ARI2M VS ARI2H <i>IN VIVO</i> .....	100
2.2.	ADICIÓN DE MACRÓFAGOS EN NUESTRO MODELO <i>IN VITRO</i> .....	105
3.	ESTUDIO DEL EFECTO DEL BCMA SOLUBLE Y SU INHIBICIÓN EN LA TERAPIA CART PARA MM. ....	106
4.	PRODUCCIÓN DE ARI2M Y ARI2H PARA UN ENSAYO CLÍNICO FASE-I/II EN PACIENTES DE MM.....	111
5.	DISEÑAR UN MÉTODO EFICIENTE PARA LA TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS NK DERIVADAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL (CB-NK). ....	118
6.	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD Y EFICACIA DE UN CAR-NK FRENTE A CD19 (ARI3) PARA EL TRATAMIENTO DEL LNH. ....	123
7.	COMPARATIVA DE LA ACTIVIDAD Y EFICACIA DE UN CART19 VS UN CARNK19 PARA EL TRATAMIENTO DEL LNH <i>IN VIVO</i> .....	127
<b>Discusión .....</b>		<b>131</b>
<b>1r Estudio .....</b>		<b>133</b>

<b>2º Estudio .....</b>	<b>136</b>
<b>Discusión final .....</b>	<b>138</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>141</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>145</b>

## Índice de figuras

Figura 1 .....	23
Figura 2: .....	24
Figura 3: .....	29
Figura 4: .....	32
Figura 5: .....	37
Figura 6: .....	47
Figura 7: .....	49
Figura 8: .....	62
Figura 9: .....	79
Figura 10: .....	85
Figura 11: .....	92
Figura 12: .....	93
Figura 13: .....	94
Figura 14: .....	94
Figura 15: .....	96
Figura 16: .....	98
Figura 17: .....	100
Figura 18: .....	102
Figura 19: .....	105
Figura 20: .....	106
Figura 21: .....	108
Figura 22: .....	109
Figura 23: .....	111
Figura 24: .....	112
Figura 25: .....	114
Figura 26: .....	119
Figura 27: .....	120
Figura 28: .....	121

Figura 29: .....	122
Figura 30: .....	123
Figura 31: .....	125
Figura 32: .....	126
Figura 33: .....	127

## Abreviaturas

ADN: ácido desoribunucleico

ATCC: *American tissue culture collection*

BITES: *bispecific T cell engagers*

BIKES: *bispecific killer cell engagers*

BSA: albumina de suero bovino

CAR: receptor quimérico de antígeno

CG: centro germinal

CM: componente monoclonal

CMH: complejo mayor histocompatibilidad

CPH: célula progenitora hematopoyética

CRS: síndrome de liberación de citoquinas

DAMP: patrones moleculares asociados a peligro

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medio

DNA: ácido desoxirribonucleico

FBS: suero bovino fetal

HLA: antígeno linfocitario humano

ITAMs: motivos de activación basados en inmunoreceptor tirosina

Ig: inmunoglobulina

KIRs: Killer immunoglobulin(Ig)-like receptors

LH: Linfoma de Hodgkin

LLA: leucemia linfocítica aguda

LMC: leucemia mieloide crónica

LNH: Linfoma de no Hodgkin

MM: mieloma múltiple

MDSC: células mieloides supresoras de tumor

NCR: receptores naturales de citotoxicidad.

NK: natural killer

NSG: secuenciación de última generación

OAF: factores activadores de osteoclastos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa del inglés

PFA: paraformaldehído

PLC: progenitor linfoide común

scFv: fragmento variable de la cadena única

SH: suero humano

TAE: Tris/ Acetic acid/ EDTA

TNF: tumor necrosis factor

VIH: virus de la inmunodeficiencia adquirida

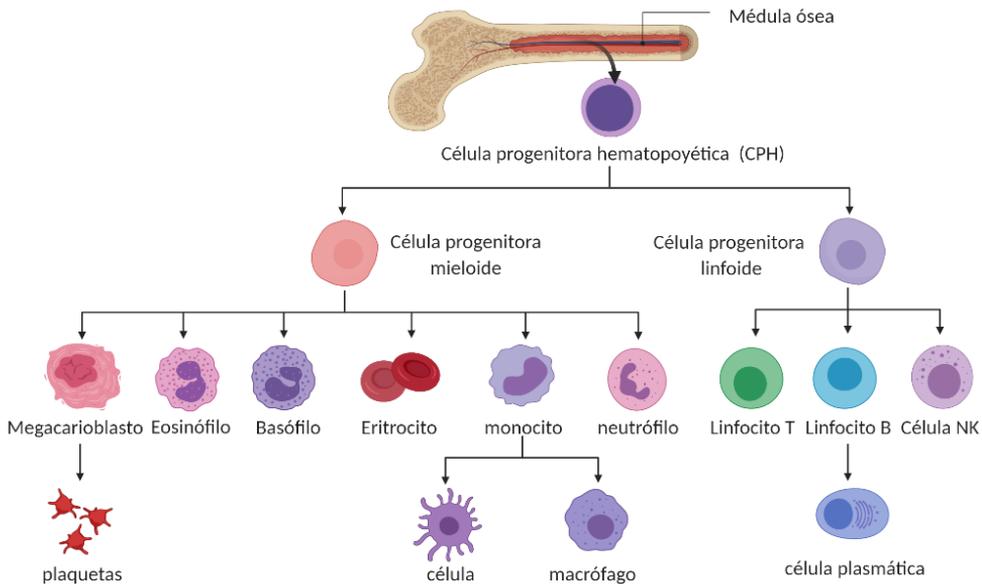
# Introducción



## 1. Neoplasia hematológica

El cáncer es definido como el crecimiento anormal de un grupo de células debido a anomalías en los circuitos de regulación que lideran la proliferación y homeóstasis de las células sanas<sup>1</sup>. En la actualidad es uno de los conjuntos de enfermedades más graves, siendo la segunda causa de muerte global, responsable de 9,6 millones de muertes en 2018<sup>2</sup>. En Europa se estimaron 3,91 millones de cánceres nuevos y 1,93 millones de muertes en 2018<sup>3</sup>.

Las neoplasias hematológicas son generalmente enfermedades de gente de edad avanzada siendo la media entre los 65 y 70 años. El aumento de la esperanza de vida en los países desarrollados incrementará no solo el número de pacientes sino también de mayor edad con enfermedades hematológicas en los próximos años<sup>4</sup>. Las neoplasias hematológicas también conocidas como cánceres de la sangre se definen por la expansión clonal de células hematopoyéticas pudiendo afectar a la médula ósea o los órganos linfáticos primarios (timo y médula) y secundarios (bazo, placas de Peyer en el tracto gastrointestinal, amígdalas, ganglios linfáticos)<sup>3</sup>. En base al estado de diferenciación y al tipo de célula inmune afectada en el momento de la transformación celular diferenciamos entre leucemias, linfomas de Hodgkin (LH) o de no Hodgkin (LNH) y mieloma múltiple (MM). La hematopoyesis es el proceso de formación, desarrollo y especialización de las distintas células inmunes y de la sangre<sup>3</sup>. Empieza a partir de la quinta o sexta semana del crecimiento fetal en el hígado para después desplazarse al bazo, timo y en última estancia a la médula ósea<sup>5</sup>. Todas las células provienen de un progenitor común, la célula progenitora hematopoyética (CPH) con capacidad de autorrenovación y de diferenciarse en las dos células progenitoras de los dos linajes; linfoide y mieloide que darán lugar a todos los tipos celulares hematológicos<sup>3</sup> (Fig.1). El progenitor mieloide da lugar a todas las células que conforman la sangre y parte del sistema inmune: eritrocitos, megacariocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos. El progenitor linfoide común da lugar a los linfocitos T que se diferenciarán a los linfocitos T efectoros o humorales, los linfocitos o células asesinas naturales (NK de sus siglas en inglés) y los linfocitos B que darán lugar a las células de memoria y a las células plasmáticas. Durante la diferenciación de los linfocitos B, estos pueden acumular una serie de mutaciones que den lugar a los LNH de célula B o en su última etapa de diferenciación al MM<sup>6</sup>.



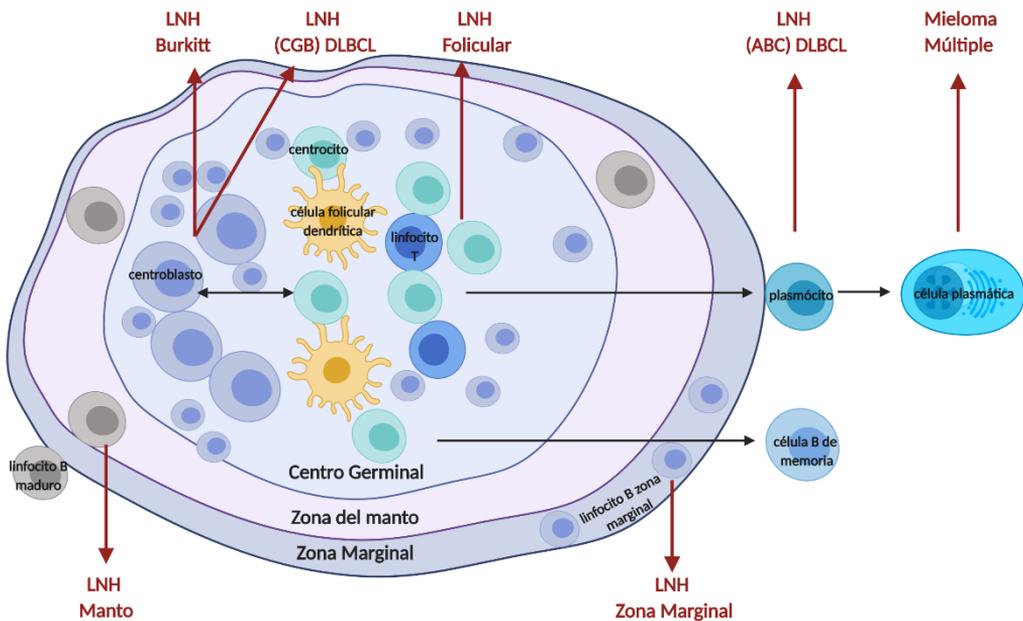
**Figura 1:** Diferenciación de las distintas poblaciones linfoides y mieloides (hematopoyesis).

### 1.1. Diferenciación de la célula B

La diferenciación del linfocito B se inicia en la médula ósea donde la CPH recibe una serie de señales y citoquinas del estroma medular que permiten su diferenciación a progenitor linfoide común (PLC) que sigue su transformación hacia una célula pro-B. Durante esta etapa, tiene lugar el reordenamiento de los genes que codifican los segmentos variables de las cadenas de inmunoglobulinas V-(D)-J en la célula pro-B y el desarrollo de inmunoglobulinas (Ig) citoplasmáticas IgM e IgD en la siguiente fase de célula pre-B pasando a ser un linfocito B maduro o también denominado virgen. En este punto, el linfocito B virgen abandona la médula ósea para entrar en la circulación sanguínea e ir a los órganos linfoides secundarios preferentemente el bazo y ser diferenciado a una célula plasmática o una célula B de memoria (Fig.2)<sup>5,7</sup>.

Cuando los linfocitos B entran en los órganos linfoides secundarios migran hacia su corteza donde se encuentran los folículos linfoides, estos folículos primarios cuando son expuestos a un estímulo antigénico se desarrollan a folículos secundarios formando el centro germinal (CG). El CG se divide en varias zonas, la zona periférica denominada zona del manto y la zona central que se diferencia entre la zona clara integrada mayoritariamente por centrocitos y la zona oscura integrada por centroblastos. En algunos órganos linfoides existe también una región periférica a la zona del manto denominada zona marginal, donde hay un acumulo de células de memoria.

El linfocito B maduro migra hacia la zona oscura del CG donde es confrontado a distintos antígenos para aumentar su afinidad hacia un antígeno específico. Este proceso denominado hipermutación somática consiste en cambios de nucleótidos en los genes que codifican para los segmentos variables de las cadenas de las Ig produciendo cambios en la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno. Durante este proceso el linfocito denominado centroblasto adquiere una alta capacidad de proliferación favoreciendo la hipermutación somática varias veces en poco tiempo. Tras la activación de la célula B y la diferenciación a centroblasto estos pueden migrar hacia la zona clara del CG pasando a ser centrocitos y cambiar de isotipo de Ig, es decir, sustituir la IgM o IgD por IgG, IgA o IgE<sup>5</sup>. Los centrocitos pueden haber adquirido una mutación favorable, y por tanto, reconocer con mayor afinidad un antígeno o una mutación desfavorable que disminuya la afinidad del anticuerpo al antígeno, en ese caso, son eliminados mediante la vía de apoptosis (selección negativa). Los centrocitos favorables pueden volver a entrar en el ciclo de hipermutación somática como centroblastos o seguir su desarrollo siendo diferenciados a células B de memoria o a plasmocitos para acabar siendo células plasmáticas en su último estadio de diferenciación ya de vuelta en la médula ósea. Durante este proceso de hipermutación somática y cambio de Ig son necesarios una serie de dobles cortes en



**Figura 2:** Diferenciación del linfocito B en un folículo juntamente con los distintos tipos de LNH de célula B o MM que pueden desarrollarse durante la diferenciación final de la célula B. LNH (CGB) DLBCL: linfoma difuso de célula B grande de tipo centro germinal, LNH (ABC) DLBCL: linfoma difuso de célula B grande de tipo ABC.

la cadena de ADN que puede conllevar la adquisición de mutaciones o translocaciones en el ADN. Estas mutaciones puntuales, translocaciones u otras alteraciones de los factores de transcripción, sobre todo si están implicados oncogenes, pueden suponer una ventaja proliferativa y originar el desarrollo de los distintos tipos de linfoma de célula B o el mieloma múltiple<sup>6,8</sup> (Figura 2).

## 1.2. Mieloma múltiple (MM)

El mieloma múltiple es una neoplasia hematológica que tiene su origen en linfocitos B que se encuentran en un su último estadio de diferenciación siendo células plasmáticas. Se caracteriza por una infiltración igual o superior a un 10% de células plasmáticas, principales células productoras de Igs, en médula ósea con una sobreproducción clonal de Ig que se denomina componente monoclonal (CM) y presencia de alguno de los denominados síntomas CRAB (del inglés: hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones óseas) debidos a la enfermedad<sup>9</sup> (Tabla 1).

El mieloma múltiple corresponde aproximadamente al 1% de los cánceres mundiales y a un 10-15% de los cánceres hematológicos. En el año 2019, la sociedad americana del cáncer estimó unos 32.110 nuevos casos de MM y, desafortunadamente, unas 12.960 muertes debidas a esta enfermedad<sup>10</sup>. A pesar de los nuevos fármacos y tratamientos sigue considerándose una enfermedad incurable. La media de edad de los pacientes es de 65 años con tan solo un 15% de pacientes menores a 50 años<sup>11</sup>.

Síntomas CRAB en MM <sup>10</sup>
C: hipercalcemia <b>[Ca] &gt; 2'75mmol/L (&gt;11mg/dL)</b>
R: insuficiencia renal <b>[Creatinina] &gt; 177mmol/L (&gt;2mg/dL)</b>
A: anemia <b>[Hemoglobina] &lt; 100g/L</b>
B: lesiones óseas <b>1≥ Lesiones osteolíticas en pruebas de imagen</b>

**Tabla 1:** Signos del Mieloma múltiple para su diagnóstico.

## 1.3. Patogénesis

En principio, todas las células de MM presentan los antígenos CD38 y CD138 en su membrana con expresión variable, y entre el 60-70% de los MM expresan también el antígeno típico de las NK CD56, ausente en la mayoría de las células plasmáticas normales. Por otro lado, la mayoría de las células plasmáticas expresan el antígeno CD19 mientras que es prácticamente ausente en las células de MM<sup>5</sup>. Además, dependiendo del clon, pueden ser positivas o no y con una expresión heterogénea

para los antígenos CD20, CD22, CD10, CD45 y CD40, entre otros. También expresan varias moléculas de adhesión pertenecientes a la familia de las integrinas y las Igs importantes para la adhesión de la célula de MM en el microambiente medular. Por tanto, para apoyar al diagnóstico de un MM por inmunofenotipo se analiza un panel de varios antígenos, entre los cuáles el fenotipo CD38+ de baja intensidad, CD56+ y CD19- suele ser motivo suficiente de apoyo al diagnóstico en un 60% de los casos. En definitiva, los hallazgos de citometría de flujo en el MM consisten en encontrar un porcentaje importante (generalmente > 95%) de células con un fenotipo anormal y que comparten fenotipo, es decir, que provengan de un mismo clon<sup>5,11</sup>.

Respecto a la citogenética, al contrario que en otras enfermedades, dónde existen alteraciones cromosómicas diagnósticas de esa enfermedad, en el MM no hay alteraciones únicas que impliquen su diagnóstico. Las alteraciones cromosómicas que podemos encontrar en el MM son ganancias (trisomías) de los cromosomas 3, 5, 7, 9, 11, 15 y 19<sup>12</sup> o la pérdida del cromosoma 13 (monosomía). También existen varias alteraciones en forma de translocación que afectan a los genes de las cadenas pesadas de las Ig, situado en el brazo largo del cromosoma 14 (14q32). Por ejemplo, la translocación t(11;14) conlleva la desregulación de la ciclina D1<sup>8</sup>, mientras que la translocación t(6;14) conlleva la sobreexpresión de la ciclina D3<sup>13</sup>. Hay una hipótesis reciente que propone que al menos una de las tres ciclinas D1, D2 o D3 está sobreexpresada en el MM<sup>14</sup> y según la translocación hallada, el paciente puede tener una mejor o peor respuesta al tratamiento. De hecho, las translocaciones t(4;14), t(14;16) y la deleción (17p) definen a pacientes de alto riesgo<sup>15</sup> y menos del 10% de los pacientes no tienen hiperdiploidías o son negativos para cualquier translocación conocida<sup>13</sup>.

En general, más de la mitad de las neoplasias presentan una translocación primaria que afecta a la desregulación de determinados oncogenes, que confiere a las células capacidad proliferativa. Además de la primera mutación, que suele afectar alguna ciclina, es necesaria para la progresión del tumor una segunda mutación en otros genes. Los genes más comúnmente mutados encontrados en pacientes son *KRAS* (23%), *NRAS* (20%), *FAM46C* (11%), *DIS3* (11%) y *TP53* (8%)<sup>8</sup>, pero existen otros genes mutados como *IRF4*, *BRAF*, *TRAF3*, *CYLD*, *RB1*, *LTB PRDM1*, *EGR1*, *MAX*, *HIST1H1E* y *ACTG1* identificados mediante secuenciación de última generación (NGS de sus siglas en inglés) y que suelen estar mutados en la progresión de la enfermedad<sup>8,13</sup>. Las mutaciones primarias y secundarias diferencian el fenotipo de cada MM obteniendo un curso de la enfermedad y respuesta distinta<sup>13</sup>. Por tanto, se realiza una citogenética de médula ósea en todos los pacientes, que permite apoyar el diagnóstico.

### 1.3.1. Microambiente tumoral

En el mieloma múltiple el microambiente tumoral juega un papel importante<sup>16</sup>. Se entiende como microambiente todas las células y componentes no celulares de la médula ósea que están implicados en la formación y evolución del MM<sup>17</sup>. El componente celular se puede subdividir en células hematopoyéticas incluyendo células mieloides, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK y osteoclastos y células no hematopoyéticas incluyendo las células estromales, fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales y vasos sanguíneos<sup>17</sup>.

En condiciones fisiológicas normales el tejido óseo sigue unos ciclos de formación y resorción de hueso mediado por los osteoblastos y los osteoclastos, respectivamente. Sin embargo, en condiciones patológicas, las células de MM se adhieren al estroma de la médula ósea y este proceso se desregula produciendo una sobre-expresión de la fase de resorción ósea debido a la sobre-activación de los osteoclastos<sup>14</sup>, causando la hipercalcemia y/o lesiones óseas líticas presentes en los pacientes.

Las células de MM proceden de plasmablastos de los CG que salen a circulación y se adhieren a la médula ósea gracias al receptor CXCR4. Durante esta adhesión las células de MM producen una serie de citoquinas y factores pro-inflamatorios como IL-6 o TNF- $\alpha$ <sup>14</sup>. Todos estos factores se denominan factores activadores de osteoclastos (OAFs) que causan la sobreexpresión local del ligando de RANK (RANKL) en las células estromales y osteoblastos. Entonces, RANKL se une al receptor RANK (*receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B*) de los osteoclastos produciendo una diferenciación y maduración de los osteoclastos que causa una resorción del hueso. La osteoclastogénesis está inducida por M-CSF-1 en combinación con RANK-L y TNF- $\alpha$  e inhibida por completo con la adición de GM-CSF o IL-3<sup>9</sup>. Además de la destrucción de hueso, la adhesión de las células de MM a las células estromales y otros tipos celulares de la médula ósea activan varias cascadas de proliferación o anti-apoptóticas en las células de MM como PI-3K/Akt/mTOR/p70S6K, Ras/Raf/MAPK o JAK/STAT3 que se complementa con una liberación autocrina o paracrina de factores de supervivencia como IL-6, IL-1a, IL-1b, TNF-a, etc<sup>14</sup>.

Otras células del microambiente que juegan un papel importante en la patogénesis del MM son las células mieloides supresoras de tumor (MDSC de sus siglas en inglés), son una población heterogénea de células que en condiciones normales darían lugar a macrófagos, granulocitos y células dendríticas. Sin embargo, en el caso del MM, estas células pueden tener inhibida su proliferación y presentar además un efecto inmunosupresor, por ejemplo, aumentando la subpoblación de células Treg<sup>17</sup>. El aumento de la frecuencia de células Treg está considerado un marcador de mal

pronóstico, ya que suprimen la inmunidad anti-tumoral<sup>18</sup>. Los fármacos inmunomoduladores usados en MM como la lenalidomida o pomalidomida inhiben la expansión y función de los linfocitos Tregs<sup>19</sup>.

Además, en el microambiente se encuentran las células NK que aun encontrándose en mayores cantidades en pacientes con MM que en individuos sanos no tienen una alta capacidad citotóxica frente a las células tumorales debido al ambiente inmunosupresor. En general, las NK mediante su receptor activador NKG2D tienen la capacidad de eliminar las células tumorales por su unión a varios de sus ligandos presentes en las células dianas como el ligando MICA (*MHC class I polypeptide-related sequence A*, MICA de sus siglas en inglés) de las células de MM. Sin embargo, las células NK en pacientes de MM presentan menores niveles del receptor NKG2D, se cree que por niveles altos de MICA solubles en circulación<sup>17</sup>. La menor citotoxicidad también puede ser explicada por la expresión de PD-1 (*programmed cell death 1*, PD1 de sus siglas en inglés) en las células NK que al unirse a su ligando PD-L1 de las células MM inhibe la actividad de las NK<sup>17</sup>. Por último, encontramos a los macrófagos asociados a tumor que liberan una serie de citoquinas angiogénicas y factores de crecimiento como VEGF (*vascular endothelial growth factor*, VEGF de sus siglas en inglés) o IL-8<sup>17</sup>.

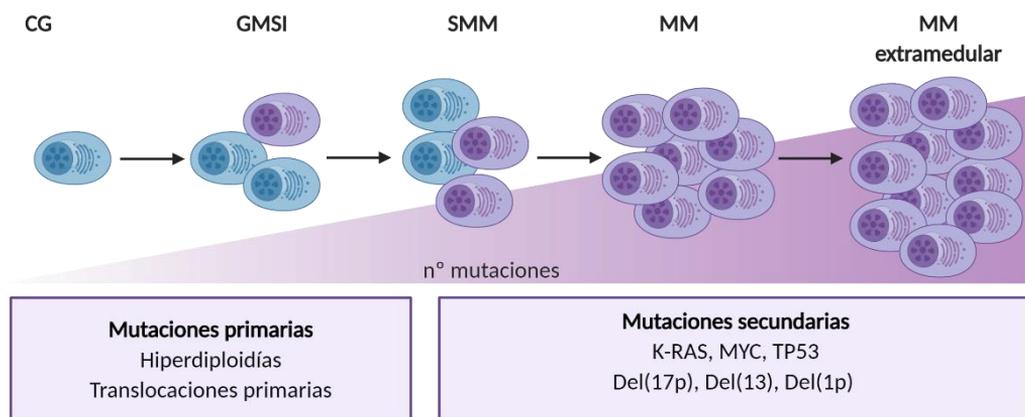
Todo este microambiente tumoral confiere al mieloma múltiple una resistencia a los tratamientos actuales como quimioterapias o glucocorticoides<sup>14</sup>.

### 1.3.2. Diagnóstico

El MM se diagnostica por cuantificación de un número igual o superior a un 10% de células plasmáticas en médula ósea y presencia de alguno de los síntomas conocidos como CRAB debido a la enfermedad.

El MM puede ser diagnosticado de *novo* o evolucionar de una gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) que puede evolucionar a un mieloma quiescente (SMM) y posteriormente a un MM (Fig.3). Las GMSI son gammopatías monoclonales debidas a la proliferación clonal de linfocitos B en sus últimos estadios madurativos (células plasmáticas y/o linfoplasmocitos) que producen un componente monoclonal. El carácter monoclonal lo define la expresión de un solo tipo de cadena ligera ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) y, cuando la paraproteína es completa, un solo tipo de cadena pesada. El tipo de inmunoglobulina implicada en la gammapatía más común es la IgG en un 70% de los casos seguida de la IgM (15%), la Ig de cadenas ligeras o también llamada Bence Jones (15%), la IgA (12%), la IgD o las gammopatías biclonales en un 3% de los pacientes y excepcionalmente IgE. La cadena ligera es  $\kappa$  en un 61% de los casos y  $\lambda$  en un 39%. Hoy en día se suelen diferenciar las GMSI IgM o no-IgM, porque las IgM

suelen cursar distinto que el resto de Ig. Los pacientes con una GMSI IgM tienen más riesgo de desarrollar una enfermedad que los pacientes con una GMSI no-IgM. Además, las IgM suelen progresar a linfoma o macroglobulinemia de Waldenström mientras que las no-IgM suelen progresar a MM<sup>20</sup>.



**Figura 3:** Evolución clonal del desarrollo del MM.

Las GMSI tienen una incidencia entre 1-5% en personas mayores de 50-80 años. El 25% evolucionan a una gammopatía maligna que en general es un MM. Están definidas por tener menos de un 10% de células plasmáticas clonales en médula ósea, un CM menor a 30 g/L y la ausencia de síntomas CRAB. El riesgo de progresión a MM es de 1% anual, sin reducción del riesgo a largo plazo<sup>13</sup>.

El mieloma quiescente, también denominado MM indolente, asintomático o *smoldering*, supone entre un 10-15% de todos los MM, con una media de edad al diagnóstico de 65-70 años. Al igual que las GMSI, tampoco presentan daño orgánico atribuible a la enfermedad, pero sí un porcentaje igual o superior al 10% de células plasmáticas en médula ósea y un CM sérico mayor a 30 g/L. El riesgo a progresión a MM es de un 10% durante los primeros 5 años, luego un 3% anual entre el 6º y 10º año y un 1% anual a partir del 10º año<sup>21</sup>.

Los pacientes diagnosticados con MM pueden presentar características que sugieran que la enfermedad sea de mayor o menor alto riesgo. Los pacientes de alto riesgo requieren tratamiento inmediato debido al elevado riesgo de evolución temprana y muerte por enfermedad<sup>15</sup>. Tienen una supervivencia alrededor de 43 meses en comparación con la media de supervivencia alrededor de 83 meses en el resto de los pacientes<sup>15</sup>. Además, los pacientes que tienen más de una alteración citogenética de alto riesgo son denominados pacientes de “ultra-alto-riesgo” con una supervivencia global de menos de 2 años<sup>15</sup>.

### 1.3.3. Tratamiento

El tratamiento del MM ha ido avanzando con los años hasta llegar al tratamiento actual basado en la combinación de varios fármacos entre los cuales se suelen incluir un inhibidor del proteasoma, como el bortezomib, un fármaco inmunomodulador, como la lenalidomida, un anticuerpo monoclonal, como el daratumumab, y corticosteroides, como la dexametasona. Los fármacos actuales actúan sobre las células de MM y también sobre el microambiente tumoral. Sin embargo, todos los pacientes incluso los que consiguen un periodo de remisión acaban recayendo, por lo que el MM sigue considerándose una enfermedad incurable<sup>22</sup>.

La primera mejora en la esperanza de vida de los pacientes con MM fue con la introducción de los fármacos melfalán y prednisona sobre finales de los años 60 que supuso un aumento de 10 meses a 24 meses<sup>23</sup>, antes se administraban fármacos como el uretano o antimetabolitos para intentar con poco éxito alterar el curso de la enfermedad<sup>24</sup>. Este tratamiento fue el estándar durante varios años hasta la implementación en los años 80-90 del melfalán a dosis altas, seguido de un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos<sup>25</sup>. Posteriormente, en 1990-2000 comenzó la nueva era del tratamiento del MM con la introducción de la talidomida, su análoga lenalidomida y el bortezomib<sup>23</sup> que incrementó de un 40% a un 66% la supervivencia a 3 años<sup>25</sup>.

Hoy en día para el tratamiento de pacientes con MM se toma en consideración la edad. Los pacientes se clasifican en jóvenes o menores de 65-70 años sin comorbilidades que pueden recibir un trasplante de progenitores hematopoyéticos autólogo, y en pacientes mayores de más de 65-70 años o pacientes jóvenes con comorbilidades relevantes a nivel renal, hepático, pulmonar o cardíaco, para los cuales es necesario individualizar cada caso<sup>26</sup>. Por ejemplo, los pacientes con insuficiencia renal que son candidatos a trasplante reciben melfalán en menor dosis. Además, si los pacientes cumplen los criterios de inclusión suelen introducirse en un ensayo clínico.

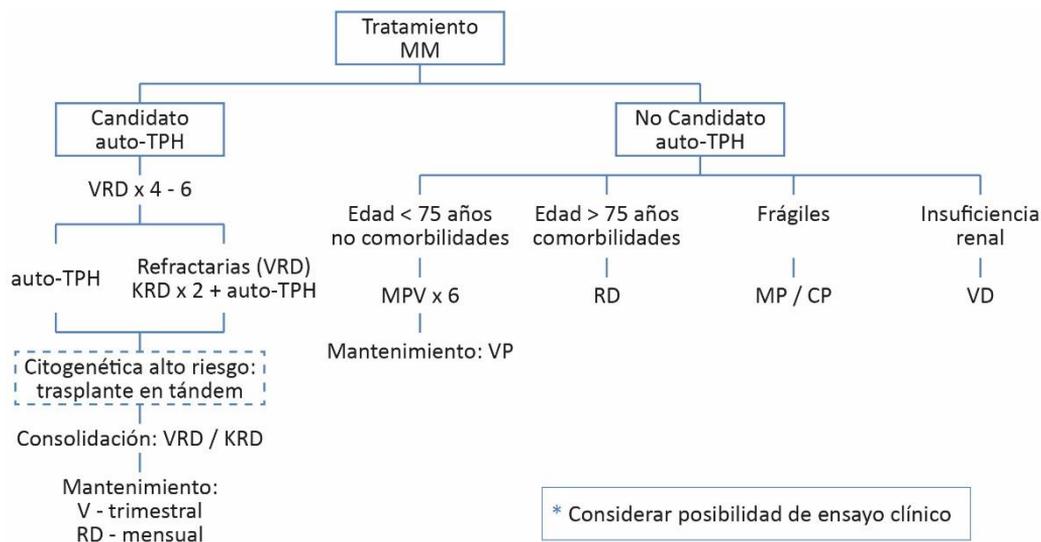
Los fármacos que se utilizan en el tratamiento del MM suelen estar compuestos por la combinación de dos o tres de los siguientes: bortezomib, un inhibidor del proteosoma, talidomida que presenta actividad anti-angiogénica, lenalidomida un inmunomodulador<sup>23</sup>, dexametasona, melfalan uno de los primeros fármacos inhibidores del proteosoma que se usó para el MM y ahora se usa para el acondicionamiento al trasplante<sup>23</sup>, prednisona, ciclofosfamida, doxorubicin o daratumumab (anti-CD38).

El tratamiento estándar en pacientes candidatos a trasplante en nuestra institución (Hospital Clínic de Barcelona) empieza con la fase de inducción, que son unos 4-6 ciclos de bortezomib (Velcade), lenalidomida (Revlimid) y dexametasona, los 3 definidos por las siglas VRD, como fármacos de referencia que pueden intercambiarse por algún otro según las necesidades de cada paciente (Figura 3). Si el paciente es refractario a VRD tras dos ciclos se rescata con 4 ciclos de carfilzomib, lenalidomida, dexametasona (KRD). Se sigue de un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos previa administración de un condicionamiento con melfalán a altas dosis ( $200\text{mg}/\text{m}^2$ ; en pacientes con insuficiencia renal se matiza la dosis a  $100\text{-}140\text{mg}/\text{m}^2$ )<sup>26</sup>. Tras el trasplante se realiza un régimen de consolidación con fármacos similares a los de la inducción y un régimen de mantenimiento con administración de bortezomib trimestral y lenalidomida y dexametasona mensual durante 3-5 años para mejorar la respuesta o hasta progresión en pacientes de alto riesgo. Los pacientes con citogenética de alto riesgo recibirán un trasplante en tándem (dos trasplantes autólogos seguidos con unos 3 meses de diferencia entre los dos) y se continuará con el tratamiento de mantenimiento.

El tratamiento estándar en pacientes no candidatos al trasplante en el Hospital Clínic se individualizará según cada paciente (Fig. 4). Si el paciente es menor de 75 años y no presenta comorbilidades se recomiendan 6 ciclos de inducción de melfalán, prednisona y bortezomib más mantenimiento con bortezomib y prednisona, aunque próximamente quedará aprobado como tratamiento estándar daratumumab, lenalidomida, dexametasona (DRd) en los pacientes no candidatos a trasplante. Los pacientes mayores de 75 años o con comorbilidades se recomienda administrar lenalidomida y dexametasona hasta progresión. En pacientes con insuficiencia renal se recomiendan bortezomib y dexametasona hasta progresión. Y para los pacientes frágiles con comorbilidades melfalán/prednisona o ciclofosfamida/prednisona hasta progresión.

El tratamiento estándar no consigue inducir una respuesta completa libre de enfermedad en todos los pacientes, y aquellos que obtienen una respuesta completa acaban recayendo con el tiempo. Por tanto, son necesarias otras pautas de tratamiento para los pacientes recaídos y/o refractarios al tratamiento habitual, ya que a medida que los pacientes reciben las sucesivas líneas de tratamiento, se van volviendo refractarios a la mayoría de los fármacos hasta agotar todas las opciones disponibles. Para los pacientes refractarios es preferible la combinación de varios fármacos a una monoterapia, como es el caso del esquema D(T)-PACE (dexametasona, talidomida, cisplatino, doxorubicina, ciclofosfamida y etopósido)<sup>27</sup> o, si cumple los criterios de inclusión, introducir el paciente en algún ensayo clínico. Los

pacientes refractarios a bortezomib, lenalidomida, carfilzomib, pomalidomida y daratumumab tienen una supervivencia media de tan solo 5,6 meses<sup>27</sup>. También se puede considerar un trasplante alogénico en pacientes jóvenes de muy alto riesgo, pero los resultados obtenidos hasta el día de hoy demuestran que un trasplante autólogo seguido de un trasplante alogénico no aumenta la supervivencia respecto a hacer un trasplante autólogo en tándem en pacientes de alto riesgo<sup>28</sup>. Las bajas supervivencias de los pacientes con MM que reciben un trasplante alogénico son debidas, principalmente, a las propias comorbilidades asociadas al trasplante alogénico, sobre todo la enfermedad de injerto contra el huésped (EICH), más que a la propia enfermedad. Por tanto, es necesario disminuir las comorbilidades asociadas al trasplante alogénico para poder considerar esta terapia como otra opción más de tratamiento en pacientes de MM.



**Figura 4:** Esquema del tratamiento en pacientes con MM. VRD: bortezomib, lenalidomida, dexametasona. KRD: carfilzomib, lenalidomida, dexametasona. MPV: melfalán, prednisona, bortezomib. CP: ciclofosfamida, prednisona.

## Nuevos tratamientos

La falta de fármacos eficientes que lleven a los pacientes a una remisión completa duradera hace necesaria la búsqueda e innovación de nuevos fármacos. Los nuevos tratamientos están mayoritariamente englobados en el campo de la inmunoterapia en forma de anticuerpos monoclonales como el daratumumab (anti-CD38) y el elotuzumab (anti-CS1), ambos aprobados por la FDA (agencia americana del medicamento) para el tratamiento del MM, anti-PD-1 o anti-PD-L1 (aunque han demostrado una alta toxicidad en pacientes) y linfocitos T modificados genéticamente (explicado en detalle en el apartado 3.1). Además de estos nuevos tratamientos de

inmunoterapia, hay nuevos fármacos inhibidores del proteasoma como el carfilzomib, ixazomib, marizomib y oprozomib<sup>29</sup>.

#### 1.4. Linfoma no Hodgkin (LNH)

El linfoma es un tumor sólido de células inmunes presentes en el sistema linfático, sobre todo de linfocitos B, aunque el 10-15% son de linfocitos T o NK, normalmente se desarrolla en los nódulos linfáticos, pero puede afectar a cualquier órgano<sup>30</sup>. Tradicionalmente se divide en dos tipos: el linfoma de Hodgkin (LH), que corresponde al 10% de los casos<sup>30</sup> y el linfoma de no Hodgkin (LNH) en el 90% de los casos, subdividido en varias entidades distintas.

El LNH es un cáncer con una alta incidencia en la población mundial, además, en los últimos años se observa un incremento de la incidencia en varios países como Inglaterra, Brasil o Japón<sup>31,30</sup>. En el 2016 hubieron unos 135.000 nuevos casos de LNH en Estados Unidos<sup>32</sup>. Afortunadamente, la supervivencia para esta enfermedad también ha incrementado, siendo hoy en día de un 50,8% a los 10 años, en comparación con el 21,8% de supervivencia en los años 70s<sup>30</sup>.

El LNH de célula B se divide en varias entidades según el inmunofenotipo, morfología, perfil genético y sintomatología clínica que presente el paciente (Figura 2). Los LNH más comunes son el linfoma difuso de célula B grande (DLBCL) y el linfoma folicular (LF), solo estas dos entidades corresponden al 65% del total, además coinciden por ser el DLBCL uno de los linfomas más agresivos juntamente con el linfoma de Burkitt (LB) y el LF uno de los más indolentes<sup>33</sup>.

Los LNH de célula B suelen originarse durante la diferenciación de los linfocitos B en el centro germinal (CG), por tanto, la entidad de LNH y sus características dependerá del estado de diferenciación de la célula cuando se transformó en maligna<sup>6</sup>. Según la última revisión de la organización mundial de la salud (OMS) hay más de 40 tipos de LNH de célula B<sup>32,34</sup> (tabla 2).

<b>Neoplasias de células B maduras<sup>34</sup></b>
Leucemia linfática crónica de células B/ linfoma linfocítico de células pequeñas
Linfocitosis de célula B monoclonal
Leucemia prolinfocítica de células B
Linfoma de células B de la zona marginal esplénica
Tricoleucemia
Linfoma/leucemia de célula B esplénico no clasificable
Linfoma linfoplasmocitoide /Macroglobulinemia de Waldenström
Gammapatía monoclonal de significado incierto
Enfermedad de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas

Mieloma de células plasmáticas/ Plasmocitoma
Linfoma de células B extraganglionar tipo MALT
Linfoma nodal de la zona marginal
Linfoma folicular
Linfoma folicular pediátrico
Linfoma primario cutáneo de centro folicular
Linfoma de células del manto
Linfoma difuso de células B grandes (tipo célula B centro-germinal o tipo célula B activado)
Linfoma de células grande B rico en células T e histiocitos
Linfoma primario de mediastino de células B grandes
Linfoma primario de células B grandes del sistema nervioso central
Linfoma primario cutáneo de células B grandes de tipo extremidades inferiores
Linfoma de células B grandes ALK+
Linfoma primario de cavidades
Linfoma de células grandes B intravasculares
Linfoma plasmoblástico
Linfoma de Burkitt/ Leucemia de células de Burkitt
Linfoma de células B de alto grado, con reordenamiento de MYC y BCL2 y/o BCL6
Linfoma de célula B de alto grado, no especificado
Linfoma de célula B, no clasificable, con rasgos intermedios entre LDCG y linfoma de Hodgkin clásico

**Tabla 2:** Clasificación de los LNH de célula B según la última clasificación del 2016 por la OMS<sup>34</sup>.

#### 1.4.1. Diagnóstico

Las pruebas de imagen juegan un papel fundamental tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de la enfermedad aunque el diagnóstico de un LNH es también confirmado por sus características biológicas, inmunofenotipo y análisis genético<sup>35</sup>.

Tanto el DLBCL como el LB pueden presentar la translocación de *MYC*, por tanto el diagnóstico diferenciado es muy importante debido al posterior distinto tratamiento de las dos entidades<sup>36</sup>. Algunos linfomas son diagnosticados como DLBCL por sus características histológicas pero en realidad son LB por su expresión génica<sup>36</sup>. Por ello, es muy importante realizar todas las pruebas necesarias como pruebas de imagen, analíticas, aspirado de la médula ósea y biopsias para estudiar el fenotipo de las células tumorales tanto por citología como por citometría de flujo<sup>36</sup>.

#### 1.4.2. Linfoma difuso de célula B grande (DLBCL)

Constituye el tipo de linfoma más común en países occidentales correspondiendo al 30-40% de los linfomas diagnosticados<sup>6</sup>. Hay varios subtipos de DLBCL incluyendo el primario DLBCL de sistema nervioso central, el primario de tejido cutáneo DLBCL o el primario de mediastino de célula B (LPMCGB)<sup>32</sup>.

La mediana de edad es superior a 60 años, es una enfermedad bastante agresiva pero potencialmente curable con más de 70-80% de respuestas completas. Se caracteriza por aparecer una masa que crece rápidamente en un ganglio linfático localizado en pecho, abdomen, cuello o axila normalmente, aunque también puede aparecer en otras zonas como intestinos, huesos, etc<sup>37</sup>.

### Patogénesis

En base al estadio de diferenciación de la célula B, el DLBCL se puede dividir en un tipo más parecido a célula B de centro germinal (GCB) con mejor pronóstico o tipo célula B activada (ABC) asociado con peor pronóstico<sup>32</sup>. Los dos subtipos al provenir de estadios distintos tienen una expresión variable de muchos genes, alteraciones cromosómicas distintas, activación de diferentes vías de señalización, y por tanto, unas características clínicas y unas ratios de supervivencia muy distintos<sup>38</sup>.

El clon maligno del linfoma GCB suele mantener una hipermutación somática y haber cambiado el tipo de Ig. Suele presentar la traslocación t(14;18) o delección del gen supresor de tumor *PTEN* y mutaciones en p53<sup>6</sup>.

EL ABC suele presentar constitutivamente activa la vía NF-kB que causa la expresión del factor de transcripción IRF4 y empuja la célula a la diferenciación a célula plasmática. Este subtipo también adquiere mutaciones en el gen *BLIMP-1* que bloquea la diferenciación completa a célula plasmática<sup>6</sup>. La mayoría de los diagnósticos ABC sobre-expresan BCL2, tienen delecciones en el locus *INK4A-ARF* que codifica para p16 (inhibidor de la senescencia) y p14 (inhibidor de la activación de p53). Muchas de estas mutaciones bloquean la acción de la quimioterapia<sup>6</sup>.

### Tratamiento

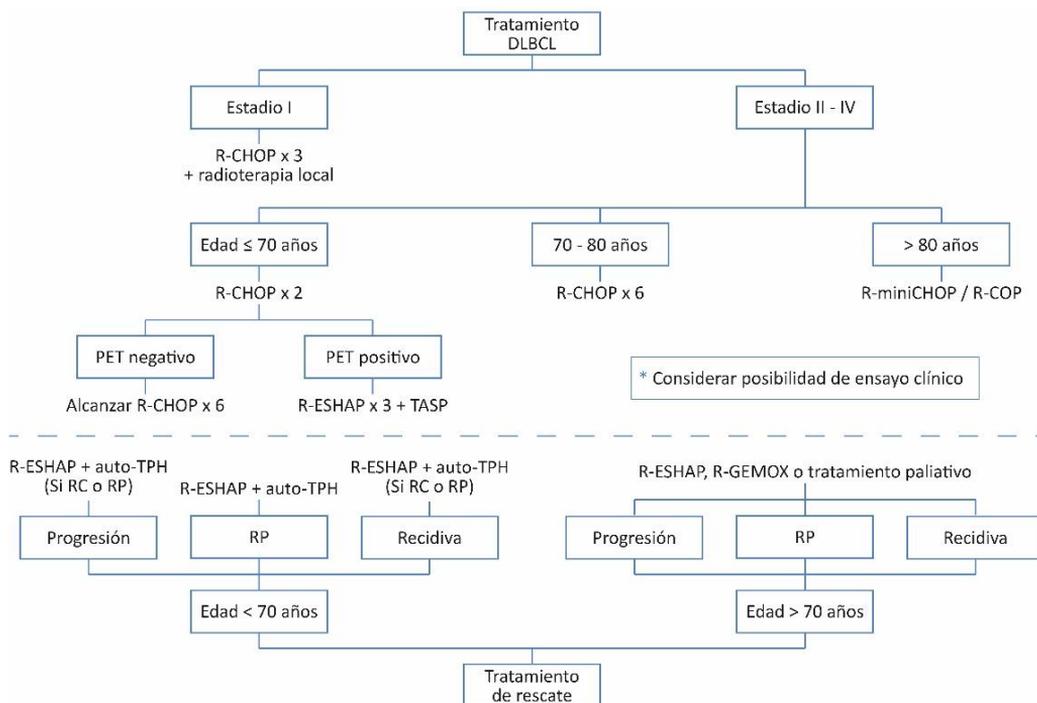
El tratamiento estándar suele ser unos 6 ciclos de R-CHOP que es una combinación de rituximab con quimioterapia: ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona<sup>39</sup>. Con este tratamiento, seguido o no de radioterapia focal alrededor del 50% de los casos se curan<sup>6</sup>. Sin embargo, hay varios estudios que indican que regímenes de mayor intensidad como ACVBP-R (doxorubicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina, prednisona y rituximab) en pacientes jóvenes pueden aumentar la supervivencia de estos<sup>30</sup>.

Cuando el paciente recae, el tratamiento habitual consiste en quimioterapia de rescate seguida de un trasplante autólogo. Para los pacientes que recaen tras el trasplante autólogo o que no son candidatos a este, quedan muy pocas opciones de tratamiento<sup>40</sup>.

Los pacientes con mutaciones en MYC y BCL2 o BCL6 suelen ser pacientes con linfomas en una fase intermedia entre DLBCL o linfoma de Burkitt, de hecho, en la nueva clasificación de la OMS pasan a ser linfomas de célula B de alto grado con reordenamiento de MYC y BCL2 y/o BCL6<sup>34</sup>. Los pacientes con MYC y BCL2 mutados suelen tener su origen en el centro germinal, mientras que los pacientes con MYC y BCL6 mutados son más del tipo ABC. Estos subtipos de pacientes tiene una baja tasa de respuestas completas tras tratamientos convencionales de quimioterapia y suelen recaer durante la terapia<sup>30</sup>.

El tratamiento actual para el DLBCL en nuestro centro, el Hospital Clínic de Barcelona, es igual al estándar (Fig. 5). Cuando la enfermedad está en estadio I se recomiendan 3 ciclos de R-CHOP seguido de radioterapia local. Si la enfermedad se encuentra avanzada entre estadios II-IV el tratamiento se divide según la edad del paciente. Si el paciente tiene menos de 70 años se recomiendan dos ciclos de R-CHOP y tras evaluación por PET (tomografía por emisión de positrones) si es negativa seguir con R-CHOP hasta alcanzar los 6 ciclos, si bien se observa una respuesta baja al tratamiento seguir con tres ciclos de R-ESHAP (rituximab, cis-platino, etopósido, prednisona y Ara-C). En pacientes de entre 70 y 80 años 6 ciclos de R-CHOP y en pacientes mayores de 80 años R-miniCHOP, es decir, con mitad de dosis de ciclofosfamida y adriamicina.

En todos los casos también se considerará la inclusión del paciente en un ensayo clínico si es posible y cumple con los criterios de inclusión. El tratamiento de rescate en menores de 70 años se basa en R-ESHAP seguido de un trasplante autólogo, en mayores de 70 años se valorará R-ESHAP, R-GEMOX (rituximab con gemcitabina y oxaliplatino) o tratamiento paliativo (Fig. 5).



**Figura 5:** Esquema del tratamiento en pacientes con DLBCL. R-CHOP: rituximab, ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona. R-miniCHOP: mitad de dosis de ciclofosfamida y adriamicina. R-COP: rituximab, ciclofosfamida, vincristina, prednisona. R-ESHAP: rituximab, cis-platino, etopósido, prednisona, Ara-C. TASP: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos. R-GEMOX: rituximab, gemcitabina, oxaliplatino. RC: respuesta completa. RP: respuesta parcial.

### 1.4.3. Linfoma de Burkitt (LB)

El linfoma de Burkitt (LB) es uno de los linfomas más agresivos, puede manifestarse de forma esporádica, endémica o asociado a inmunodeficiencia<sup>35,36</sup>. La forma esporádica generalmente se presenta en la población de EEUU y Europa occidental, sobre todo en población pediátrica donde corresponde al 30% de los linfomas, mientras que en adultos corresponde a menos del 1% de los linfomas, también está relacionado con el virus del Epstein-Barr (EBV)<sup>35</sup>. La forma endémica se observa sobre todo en África ecuatorial y Nueva Guinea, donde corresponde hasta al 50% de los cánceres infantiles estando muy asociado a EBV<sup>35</sup>. Por último, la forma asociada a la inmunodeficiencia se presenta prácticamente en su totalidad en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV) aunque también puede ser desarrollado en pacientes con otras inmunodeficiencias congénitas<sup>35</sup>.

Es una de las enfermedades con un mayor índice de proliferación, suele presentarse de forma extranodal incluyendo mandíbula, abdomen y órganos endocrinos con

tendencia a diseminarse al sistema nervioso central (CNS)<sup>30</sup>, también es uno de los tumores más asociados con el VIH<sup>32</sup>. Por tanto, es clave diagnosticarla y tratarla a tiempo, mostrando una supervivencia de más del 80% en pacientes con tratados con el régimen estándar de quimioterapia.

### Patogénesis

El LB deriva de células B del CG, por tanto, tiene un fenotipo de linfocito B maduro, expresa CD10, BCL6, CD19, CD20, CD22, CD79a, CD45 y normalmente secretan IgM<sup>36</sup>.

El desarrollo del LB está directamente relacionado con la sobreexpresión del factor de transcripción C-MYC localizado en el cromosoma 8q24 responsable de la regulación de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis<sup>35</sup>. La mayoría de casos presentan una translocación que afecta por un lado a los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en el cromosoma 14 y por otro lado a la región de *MYC* del cromosoma 8, siendo la translocación más común t(8,14) (q24;q32)<sup>41</sup> que confiere una sobreexpresión de MYC y un aumento en la proliferación celular<sup>35</sup>. También puede afectar a los genes de la cadena ligera de la inmunoglobulina en el cromosoma 2 (kappa) o 22 (lambda)<sup>32</sup>. Igualmente hay otras mutaciones recurrentes en los LB como en el factor de transcripción *TCF3* en el 10-25% de los casos o en su regulador negativo el gen *ID3* en el 35-58% de los casos<sup>34,36</sup>. Por tanto, una de las dos mutaciones suele presentarse en el 70% de los casos de LB y a la vez son ausentes en el DLBCL<sup>32</sup>. *TFC3* promueve la supervivencia y proliferación de las células linfoides activando la vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y modulando la expresión de la ciclina D3, que también se encuentra mutada en el 30% de los casos<sup>34</sup>.

El LB con la mutación 11q es reconocido como una nueva entidad por la clasificación de 2016 de la OMS<sup>34</sup>. Este tipo tiene como particularidad la no translocación de *MYC*. Estos linfomas tienen cariotipos más complejos, con menor expresión de MYC, una presentación nodal y ocasionalmente un patrón semejante al linfoma folicular<sup>34</sup>.

### Tratamiento

Los estudios reportan entre 80-90% de supervivencia en adultos con linfoma de Burkitt con regímenes como CODOX-M-IVAC (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, metotrexato con etopósido, ifosfamida y citarabina) o CVAD (combinación de ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, dexametasona, metotrexato y citarabina)<sup>30</sup> u otros parecidos. Antes de iniciar el tratamiento y durante el transcurso de este, se tiene que analizar la posibilidad de que el paciente desarrolle el síndrome de lisis tumoral o una metástasis al CNS. Para evitar el síndrome de lisis tumoral los tratamientos suelen empezar con una baja dosis de quimioterapia normalmente con ciclofosfamida o prednisona, además de fármacos

como el metotrexato o la citarabina con capacidad de penetración al CNS<sup>36</sup>. Los tratamientos actuales consiguen una alta tasa de remisión sobre todo en pacientes pediátricos o adultos jóvenes pero la alta toxicidad asociada al tratamiento es todo un reto en pacientes mayores o inmunosuprimidos<sup>42</sup>. Por ello, los adultos con mejor pronóstico reciben una quimioterapia más corta o menos agresiva<sup>36</sup>. Además, la adición del rituximab al tratamiento incrementa la tasa de supervivencia, siendo mayor de un 90% en los adultos con EPOCH-R (etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina y rituximab)<sup>30</sup>.

Los pacientes con recaídas o refractarios a la quimioterapia suelen tener un mal pronóstico y una baja supervivencia. Por ello, son necesarios nuevos tratamientos como inhibidores de *MYC* o la terapia con células modificadas con un receptor quimérico antigénico (CAR), que se discutirá en los siguientes apartados<sup>36</sup>.

## 2. Respuesta inmunitaria

Existen tres niveles de defensa inmunitaria, en primer lugar, encontramos la barrera física formada por la piel junto con las secreciones mucosas que recubren las capas epidérmicas de los aparatos respiratorio, digestivo y reproductor. En segundo lugar, está la respuesta inmune innata producida casi inmediatamente después de que un agente infeccioso entre al cuerpo humano. Es una defensa bastante amplia pero inespecífica que reconoce componentes conservados de agentes infecciosos denominados patrones moleculares asociados con el daño (DAMPs, de sus siglas en inglés). Las células propias de la respuesta inmune innata son los macrófagos, los neutrófilos y las células citotóxicas naturales, más conocidas como NK. Además de su propio papel defensivo, el sistema inmune innato también es responsable de iniciar el tercer nivel de defensa, la respuesta inmune adquirida, la más tardía en activarse en el tiempo. Esta respuesta comienza unos 4-5 días tras la incorporación del patógeno, es específica de antígeno y tiene memoria inmunitaria. Las principales células del sistema inmune adaptativo son los linfocitos T y B que tras el reconocimiento del antígeno proliferarán y se diferenciarán para ejercer una mayor respuesta frente a las células que presenten ese antígeno concreto<sup>43</sup>. Sin olvidar, las células dendríticas que normalmente ejercen la función de células presentadoras de antígeno (APC de sus siglas en inglés) y son las principales células responsables de presentar los antígenos mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) a los linfocitos e iniciar la respuesta inmune adaptativa<sup>44</sup>. En los últimos años se ha comenzado a estudiar el sistema inmune en mayor profundidad para usar todos estos conocimientos en la lucha contra distintas enfermedades, entre ellas el cáncer.

### 3. Inmunoterapia

El concepto de la inmunoterapia como tratamiento es mucho más antiguo de lo que podemos imaginar, tal vez se remonta a tiempos de los antiguos egipcios, pero la primera vez que se documentó fue cuando dos médicos alemanes, el Dr. Fehleisen y el Dr. Busch, describieron de forma independiente la significativa regresión de los tumores de sus pacientes tras padecer una infección por erisipela en la segunda mitad del siglo XIX<sup>45</sup>. Años más tarde, el Dr. Coley, conocido hoy en día como el padre de la inmunoterapia, fue quién recopiló todos los casos en los que pacientes tras una grave infección se curaban no solo de la infección bacteriana, sino también del cáncer que padecían<sup>46</sup>. Fue entonces cuando convencido de que la infección padecida por el paciente activaba al sistema inmune y combatía también el cáncer, empezó a tratar algunos de sus pacientes oncológicos con una pequeña dosis de bacterias vivas<sup>47</sup>. En 1891 creó la “vacuna” de Coley formada por varios patógenos inactivados por calor, con la que consiguió la remisión espontánea de varios tipos de cánceres como sarcomas o linfomas<sup>48</sup>. Posteriormente, en el siglo XX un sinnúmero de descubrimientos se fueron encadenando, como la descripción de los distintos grupos sanguíneos por el Dr. Landsteiner en 1901, el descubrimiento de las células dendríticas por el Dr. Steinman en 1973 o del receptor de las células T por los Drs. Allison, McIntyre y Bloch en 1982<sup>49</sup>. El siglo XXI está siendo el de trasladar todos los conocimientos sobre inmunoterapia a una realidad clínica, ofreciendo así nuevas terapias más específicas y por tanto menos tóxicas a los pacientes.

La inmunoterapia se puede definir como una terapia biológica basada en ayudar al sistema inmune a combatir el cáncer<sup>47</sup>.

Las células del sistema inmune tienen la capacidad de detectar y destruir las células con un crecimiento anormal o con daño en el DNA que pueden acabar transformándose en células cancerosas. El mecanismo básico para que los linfocitos T reconozcan estas células y medien una respuesta citotóxica se basa en una serie de señales en cadena. Primero, el reconocimiento y unión de los receptores de los linfocitos T (TCR) al CMH tipo I (CMH-I), presente en las células cancerosas. Segundo, la unión de los correceptores de los linfocitos como CD20, 41BB, OX40, ICOS con sus correspondientes ligandos presentes en las células presentadoras de antígeno o en las células tumorales CD80/86, CD137L, OX40L, ICOS-L<sup>48</sup>. Tras estas dos señales, los linfocitos empezarán una cascada de producción de citoquinas para promover la activación y proliferación del sistema inmune, formando una sinapsis citolítica con las células cancerosas y liberando una serie de enzimas citotóxicas como granzimas y perforinas<sup>48</sup>. Sin embargo, las células tumorales desarrollan mecanismos de evasión del sistema inmune tales como<sup>47</sup>:

- Adquisición de mutaciones genéticas o cambios epigenéticos que les permiten ser menos visibles frente al sistema inmune. Por ejemplo, la pérdida parcial o total del CMH-I.
- Expresión de una serie de proteínas o ligandos en sus membranas citoplasmáticas conocidas como *immune checkpoints* o puntos de control inmunes que inhiben la actividad de las células inmunes al unirse el receptor presente en la célula inmune con su ligando en la célula tumoral. Por ejemplo, la expresión de ligandos como PD1-L en la célula tumoral que se une a PD1 en las células inmunes.
- Desarrollo de vías oncogénicas que pueden organizar al componente inmune del microambiente para proteger y favorecer el crecimiento tumoral, en vez de que este ejerza una respuesta inflamatoria para eliminar el tumor. Por ejemplo, en una respuesta inflamatoria larga o crónica, las células tumorales pueden liberar una serie de citoquinas que favorezcan la diferenciación de los macrófagos al subtipo TAM (macrófagos asociados a tumor) que promueven la proliferación, invasión y metástasis de las células tumorales<sup>47</sup>.

La inmunoterapia se basa en modificar o mejorar el sistema inmune para evitar todos los mecanismos de evasión de las células tumorales y permitir que el sistema inmune sea una terapia más resolutiva frente al cáncer. Por tanto, dentro del concepto global de la inmunoterapia podemos encontrar varias terapias específicas, destacando las vacunas, el uso de citoquinas, las terapias basadas en anticuerpos y finalmente la terapia celular adoptiva que se discutirá ampliamente en el apartado 3.1.

Respecto al uso de vacunas en cáncer, se puede distinguir entre las vacunas preventivas y las vacunas dirigidas a antígenos tumorales. La primera opción son vacunas como la vacuna contra la hepatitis B (HBV) o el virus del papiloma humano (HPV) que nos protegen de una posible infección por el virus, el cual puede causar más adelante también la formación de un tumor<sup>45</sup>. La segunda opción son vacunas que activan el sistema inmune contra las células cancerosas<sup>50</sup>, de momento, Sipuleucel-T es la única vacuna formada por células dendríticas autólogas aprobada por la FDA para el tratamiento del cáncer de próstata<sup>51,52</sup>. Asimismo, aunque no están considerados un tipo de vacuna *per se* cabe nombrar también el mecanismo de acción de los virus oncolíticos basado en lisar las células tumorales debido a su propia replicación en ellas y en activar el sistema inmune frente a las células infectadas<sup>53</sup>. El único virus oncolítico aprobado por la FDA es el producto T-VEC, un herpes simplex-1 (HSV-1) modificado para el tratamiento de melanoma<sup>49</sup>.

Además de las vacunas y los virus oncolíticos en el conjunto de inmunoterapias, también se puede incluir el uso de citoquinas para promover la intercomunicación celular que es clave para estimular una respuesta por parte de los linfocitos T o las NK<sup>50</sup>. Hay dos citoquinas aprobadas por la FDA para su administración exógena en pacientes. La IL-2 para el melanoma metastásico o cáncer de riñón y el IFN- $\alpha$  como tratamiento adyuvante para el melanoma en estadio III<sup>50</sup>.

Respecto a la terapia con anticuerpos, existen varios tipos, los más comunes son:

1. Los anticuerpos monoclonales, que están dirigidos a una diana presente en la célula tumoral.
2. Los anticuerpos bi-específicos que mediante dos dianas redirigen a los linfocitos T a una diana presente en la célula tumora (*bispecific T cell engagers*, BiTEs por sus siglas en inglés)<sup>54</sup>.
3. Los anticuerpos bi-específicos que redirigen las NKs (*bispecific/trispecific killer cell engagers*, BiKEs o TriKEs por sus siglas en inglés) a una diana presente en la célula tumoral, además secretando citoquinas como la IL-15 en los TriKEs para favorecer la expansión de las NK.
4. Los anticuerpos frente a una diana en la célula tumoral conjugados a una droga que se liberará cuando contacte con su diana y lisar las células tumorales (*Antibodies Drug Conjugates*, ADC por sus siglas en inglés).

La eficacia de las terapias basadas en anticuerpos promueve sobre todo alguna de las siguientes estrategias:

- La respuesta citotóxica mediada por anticuerpo (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC por sus siglas en inglés)<sup>54</sup>. Por ejemplo, la unión de la región Fc de un anticuerpo, como el Daratumumab, al receptor CD16 presente en NK promueve una respuesta ADCC por parte de las NK a las células tumorales<sup>55,56</sup>.
- Promover la citotoxicidad dependiente de complemento (*complement dependent cytotoxicity*, CDC por sus siglas en inglés)<sup>10</sup>. La unión del anticuerpo a los antígenos presentes en la célula tumoral promueve la liberación de enzimas proteolíticas lisando la célula a través de los poros producidos en la membrana citoplasmática. Por ejemplo, Daratumumab es un anticuerpo monoclonal contra el antígeno CD38 presente en las células de MM, su unión promueve la respuesta CDC, además de otras como ADCC o apoptosis<sup>55</sup>.
- Activar directamente la apoptosis de las células tumorales, ser transportadores de otros fármacos que se encarguen de lisar la célula o inhibir la proliferación celular. Por ejemplo el anticuerpo ibritumomab

tiuxetan, es un monoclonal radioactivo que se une al antígeno CD20, por tanto al unirse a las células tumorales contribuye a una lisis local mediante la radiación<sup>57</sup>.

- Inhibir los denominados puntos de control del sistema inmune<sup>58,59</sup>. Hoy en día, existen varios fármacos aprobados basados en la inhibición de estos puntos de control inmunitario para combatir tumores. Por ejemplo, el uso de pembrolizumab (anti-PD-1) para el cáncer de pulmón<sup>60,61</sup> o el uso conjunto de ipilimumab (anti-CTLA-4) y nivolumab (anti-PD-1) para el tratamiento de carcinoma renal<sup>62,63</sup> o melanoma<sup>64</sup>.

### 3.1. Inmunoterapia celular adoptiva

En los últimos años se están desarrollando dos terapias muy prometedoras para combatir distintos cánceres usando células T expandidas *ex vivo*. La primera se basa en seleccionar, expandir y re-infundir los linfocitos que se encuentran infiltrados en el tumor (*Tumor-Infiltrating Lymphocytes*, TILs de sus siglas en inglés). La aproximación de los TILs se basa en seleccionar los linfocitos T presentes en la masa tumoral del paciente, mediante la disgregación mecánica de pequeñas porciones de tejido tumoral. Después las células obtenidas son cultivadas *ex vivo* en presencia de IL-2 para su activación y expansión durante aproximadamente 4 semanas<sup>65</sup>. Tras la activación, se fenotipan los TILs por citometría de flujo y se infunden de nuevo en el paciente en grandes cantidades. Estos linfocitos T expandidos reconocen específicamente las células tumorales y ejercen una gran respuesta inmune<sup>66,50</sup>. Además, una mejora de esta terapia consiste en aislar linfocitos que reconocen neoantígenos tumorales específicos de cada paciente a partir de muestras de sangre periférica, basándose en la expresión positiva para PD1<sup>67</sup>. Además, la expresión de puntos de control del sistema inmune puede servir como bio-marcadores de estas inmunoterapias, ya que se ha observado que pacientes con altos niveles de linfocitos CD8+ infiltrantes en el tumor responden mejor a la terapia con inhibidores de PD1-L<sup>63,68</sup>.

La segunda terapia basada en la modificación *ex vivo* de células inmunes, normalmente linfocitos T autólogos del paciente, consiste en modificar genéticamente los linfocitos T para que expresen en su membrana un receptor antigénico quimérico (Chimeric Antigen Receptor, CARs por sus siglas en inglés) que reconocerá específicamente un antígeno tumoral y ejercerá una respuesta citotóxica frente a las células tumorales que presenten ese antígeno<sup>69</sup>. Las principales células efectoras son los linfocitos T, aunque en los últimos años se han empezado a llevar a cabo tanto estudios en preclínica como ensayos clínicos usando células NK modificadas con un CAR como fuente de células inmunes<sup>70</sup>.

Por otro lado, también se está investigando el uso de células NK *per se* en inmunoterapia adoptiva, es decir, aprovechar la actividad citotóxica intrínseca de las NK. Especialmente, se están utilizando NK obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical<sup>71</sup>, aprovechando que esta fuente de NK alogénicas no causa EICH explicado en el apartado 3.4.

### 3.2. Terapia CAR (chimeric antigen receptor)

El diseño del CAR permite el reconocimiento específico de las células diana por parte de las células inmunes modificadas sin necesidad del procesamiento y presentación del antígeno mediante el CMH a partir de las APCs. Además, los CARs tienen la capacidad de unirse no solo a proteínas, sino también a carbohidratos, proteoglicanos y proteínas glicosiladas<sup>72</sup>.

El primer diseño de un CAR fue realizado por Gross et al. en 1989. El diseño consistió en la unión de la región variable (las cadenas  $V_H$  y  $V_L$ ) del anticuerpo monoclonal anti-2,4,6-trinitrofenol (TNP) a la región constante (las cadenas  $C\alpha$  y  $C\beta$ ) de señalización del TCR de los linfocitos para generar un TCR artificial<sup>73</sup>. Primero demostraron que uniendo las regiones variables de la cadena pesada con la cadena ligera mediante un linker flexible se obtenía la misma especificidad y afinidad que con el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo (*Fragment Antigen Binding*, Fab de sus siglas en inglés)<sup>74</sup>. Posteriormente, uniendo el fragmento variable de la cadena única (*single chain variable fragment*, scFv de sus siglas en inglés) directamente a la cadena- $\gamma$  del receptor Fc o a la isoforma CD3 $\zeta$  mediante su dominio transmembrana demostraron que este TCR quimérico artificial era capaz de activar los linfocitos T y estos ejercían una respuesta citotóxica frente a las células que presentaban el antígeno TNP independientemente del reconocimiento del CMH-I<sup>73</sup>. Los primeros CARs se diseñaron siguiendo este modelo, y estaban formados por un scFv unido directamente al receptor Fc $\gamma$  o CD3 $\zeta$  con un dominio transmembrana o no formado por ejemplo por el CD8 $\alpha$  transmembrana<sup>48</sup>. Estos CARs denominados CARs de primera generación ejercían una citotoxicidad frente a las células tumorales *in vitro* e *in vivo*<sup>75</sup>, pero al infundirse en pacientes no demostraron ningún tipo de eficacia y muy baja persistencia<sup>76</sup>. El principal problema de los CARs de primera generación fue que no contenían ningún dominio de co-estimulación, por tanto, la señal intracelular del CD3 $\zeta$  o del receptor Fc $\gamma$  no era suficiente para la total activación y/o expansión del CAR. Tras los primeros intentos con los CARs de primera generación se empezaron a diseñar los CARs de segunda generación que incorporan un dominio de co-estimulación y que son los más usados actualmente en la clínica.

### 3.2.1. Estructura de un CAR

La estructura de cualquier CAR está formada por 3 regiones o dominios: el dominio extracelular, el *hinge* y dominio transmembrana y el dominio intracelular.

El dominio extracelular codifica para un scFv específico contra un antígeno presente en las células tumorales. La mayoría de los scFv de los CARs provienen de anticuerpos murinos y eso puede conllevar a una reacción inmunológica por parte del sistema inmune de los pacientes. Las demás partes de la conformación de un CAR provienen de secuencias humanas. Por tanto, muchos de los CARs que se están diseñando actualmente están humanizando el scFv o directamente creando scFv humanos en base a librería de fagos, para evitar la reacción inmunológica por parte del sistema inmune del paciente<sup>77</sup>. Otro punto por conocer en el momento del diseño del scFv es la afinidad del anticuerpo elegido, saber si la densidad del antígeno en la célula diana y el número de receptores presentes en las células CAR será suficiente para su correcta activación y proliferación<sup>78</sup>. Para unir y modular la cadena pesada y ligera del scFv está el *linker* que es una secuencia peptídica con un número variable de aa. Normalmente de 15 a 20 aa formada por 3 o 4 estructuras repitiendo el patrón (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)*n*. El uso de aa de pequeño tamaño aporta flexibilidad y movilidad de los dominios del scFv<sup>79</sup>.

El scFv está conectado al dominio transmembrana a través del *hinge*, un espaciador extracelular, formado por una parte de la secuencia del CD28, CD8 u otras proteínas que al igual que el *linker* deberá ser de mayor o menor longitud según la estructura tridimensional del antígeno a reconocer<sup>78</sup>.

El dominio transmembrana está constituido normalmente por el dominio transmembrana del CD8, CD4, CD28 u otras proteínas y une la región extracelular con la región intracelular. El dominio transmembrana además de ser necesario estructuralmente para unir los otros dos dominios también aporta estabilidad al CAR<sup>80</sup>.

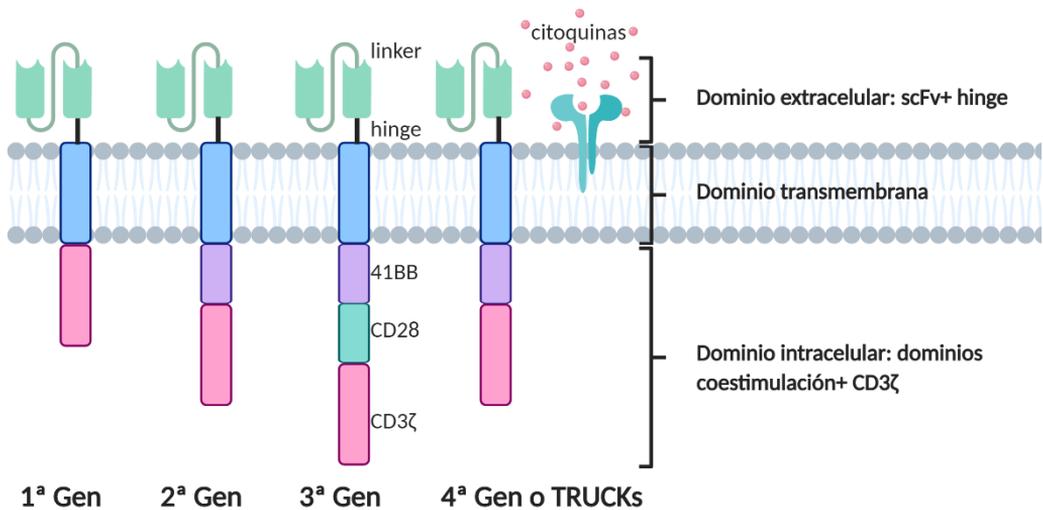
El dominio intracelular está formado por uno o varios dominios de co-estimulación y por el dominio de activación de la célula T. La activación de los linfocitos T se basa en la fosforilación de los ITAMs (motivos de activación basados en el inmunoreceptor tirosina, ITAMs por sus siglas en inglés) que están presentes en la parte citoplasmática de las distintas cadenas del TCR. Normalmente, la mayoría de los CARs tienen el dominio de activación del CD3 $\zeta$  (CD247) que es una de las cadenas que compone el TCR. Feucht *et al.* han publicado recientemente que rediseñar los CARs solo con uno de los 3 ITAMs que contiene el CD3 $\zeta$  podría ayudar a evitar una señal de activación redundante, disminuir el agotamiento de los CAR-T y diferenciarlos hacia un perfil más

de linfocito T de memoria central que efector<sup>81</sup>. Por otro lado, la adición del dominio de co-estimulación consiguió mejorar la persistencia del CAR *in vivo*. La función del dominio co-estimulador es proveer la segunda señal co-estimuladora requerida por los linfocitos T para su activación, que en condiciones fisiológicas viene dada por la interacción de CD80 y CD86 en las APCs con su ligando CD28 en los linfocitos T. La ausencia de esta señalización conlleva la anergia de los linfocitos T. El dominio co-estimulador al proveer de esta señal lleva a la proliferación o expansión y persistencia del CAR<sup>82</sup>. Los dominios de co-estimulación más comunes que se han usado en la clínica suelen ser el CD28<sup>80</sup> o el 4-1BB<sup>83</sup>, aunque hay otros como OX40, DAP10 o ICOS. El primer estudio en pacientes que demostró la utilidad del dominio de co-estimulación se realizó en 2011 mediante una comparación directa entre pacientes con LNH tratados con un CAR anti-CD19 de primera generación y un CAR de segunda generación anti-CD19 con el dominio de co-estimulación CD28, demostrando que el CAR de segunda generación CD19-28 tenía una mayor activación, persistencia e infiltración en el tumor<sup>80</sup>. Posteriormente, en los primeros ensayos clínicos con células CART en pacientes la decisión de usar uno u otro dominio de co-estimulación parecía arbitraria. Sin embargo, los resultados clínicos han mostrado que mientras los CARs con dominios CD28 tienen una mayor activación los que contienen 4-1BB por el contrario tienen una mayor persistencia mostrando menor expresión de marcadores de agotamiento<sup>84,85</sup>.

### 3.2.2. Generaciones de CARs

En función de los dominios de co-estimulación existen tres generaciones de CARs. Además, están los llamados TRUCKS (T-cell redirected for universal cytokine mediated killing<sup>50</sup>) o CARs de cuarta generación que añaden otros dominios con distintas funciones a la del dominio co-estimulador. Así, se distinguen:

- Primera generación: sin dominio de co-estimulación.
- Segunda generación: contienen un dominio de co-estimulación.
- Tercera generación: contienen 2 dominios de co-estimulación.
- Cuarta generación: contienen uno o dos dominios de co-estimulación, más otro dominio inducible o constitutivo diseñado para la liberación de ciertas citoquinas activas como la IL-2, IL-12 la IL-15, anticuerpos o ligandos de forma autocrina o paracrina para una mayor activación del CAR o del sistema inmune próximo<sup>86,87</sup>. Por ejemplo, un CART anti-CAIX para carcinoma renal que secreta de forma paracrina el anticuerpo anti-PD-L1<sup>88</sup> y aumenta la eficacia del CART en un tumor sólido, donde los efectos del CART son menos pronunciados debido al ambiente inmunosupresor de los tumores sólidos.



**Figura 6:** Esquematación de la estructura y los dominios presentes en un CAR según su generación.

Además de las distintas generaciones de CARs también se están desarrollando los denominados CARs universales que permitirían el uso de un mismo producto de CAR-T en varios pacientes sin tener en cuenta el HLA (antígeno leucocitario humano) del paciente. Por el momento, los CAR-T son autólogos, es decir, los linfocitos T tienen que provenir del propio paciente a tratar. Este requisito puede dificultar la administración de la terapia en varios puntos que se verían anulados si se pudiese disponer de los CARs universales<sup>87</sup>:

- 1- El número de linfocitos T del paciente a veces puede no ser suficiente para la producción de esta terapia, mayoritariamente debido a linfopenias relacionadas con el tratamiento previo.
- 2- Los linfocitos T de los pacientes expuestos a citotóxicos pueden no estar en las mejores condiciones.
- 3- El periodo de tiempo que transcurre entre la indicación de tratamiento con terapia CAR hasta la obtención del producto y su infusión en el paciente puede tener una duración que sea inasumible respecto al curso de la enfermedad en el paciente.

El diseño de un CAR universal se basa en la eliminación del TCR endógeno usando técnicas de edición génica<sup>85</sup>. Eyquem, et al.<sup>89</sup> y Macleod, et al<sup>90</sup>. publicaron la edición génica de los linfocitos mediante la técnica CRISPR/Cas9 en los cuáles eliminaron el gen TRAC que codifica para el TCR e insertaron la secuencia que codifica para el CAR en ese mismo locus, consiguiendo prácticamente una inhibición total del TCR y una

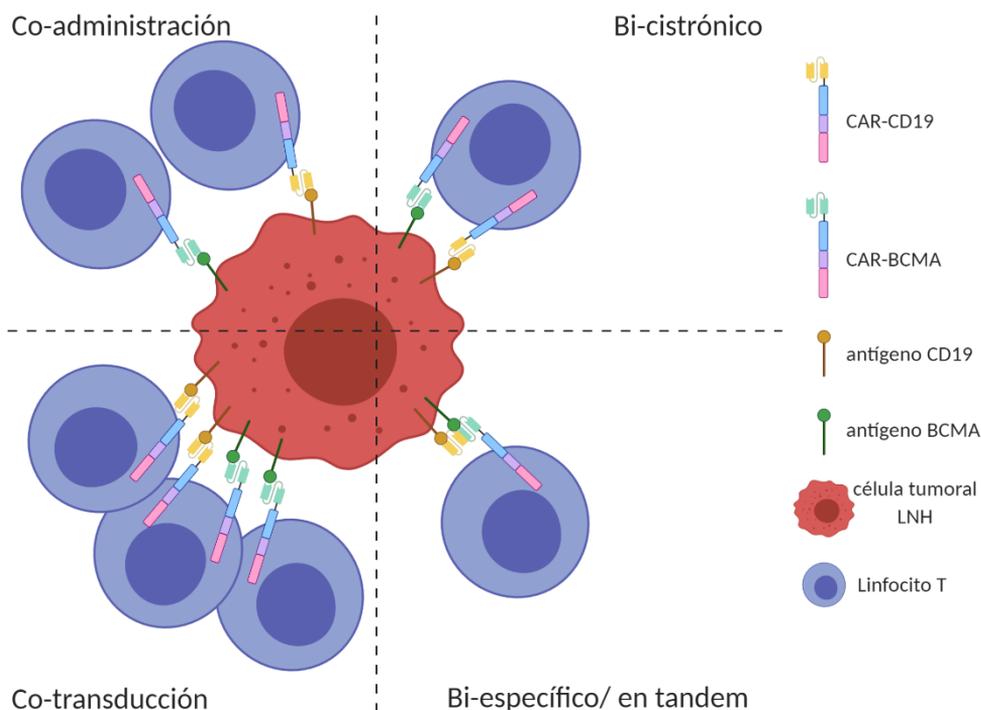
alta potencia y actividad del CAR. A día de hoy, la mayoría de los estudios están en fase de pre-clínica, aunque hay un estudio publicado de dos pacientes pediátricos tratados con un CART universal para LLA (UCART19). Los linfocitos T fueron editados genéticamente para eliminar la cadena  $\alpha$  del TCR (*TRAC*) y el locus *CD52* mediante la técnica TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*)<sup>91</sup>. Tras la edición génica y la selección negativa de los linfocitos +CD52 y +TCR $\alpha\beta$ , solo el 0,7% de linfocitos T expresaban el TCR. Sin embargo, esta mínima población positiva fue expandiéndose en las dos pacientes, resultando en síntomas de EICH que tuvieron que ser tratados mediante esteroides. Las dos pacientes obtuvieron respuestas completas tras una única infusión de UCART19 seguido de un alo-trasplante del mismo donante<sup>91</sup>. De hecho, están abiertos dos ensayos clínicos para pacientes pediátricos (NCT02808442) y adultos (NCT02746952) con el CAR UCART19 y hay también otros ensayos clínicos en marcha como un CART anti-CD123 (NCT04230265) para enfermedades hematológicas y un CAR anti-BCMA (NCT04093596).

### 3.2.3. Limitaciones y toxicidades de la terapia CAR

La terapia CAR también tiene sus limitaciones como cualquier otro tratamiento, una de las principales es la pérdida de expresión del antígeno diana en las células tumorales. Esta pérdida puede deberse a diversas causas como pueden ser mutaciones *de novo* que ocurren en la célula tumoral, un *splicing* alternativo que genera una variante nueva del antígeno que no se expresa en la superficie o también puede ser debido a una población heterogénea de células tumorales en la que una proporción no expresa el antígeno diana<sup>72</sup>. Estas limitaciones, hacen que reconocer un solo antígeno tumoral no sean suficiente, y que, por tanto, se estén diseñando CARs bi-específicos que reconocen más de un antígeno a la vez. Según la estrategia escogida hay cuatro posibles productos CARs para reconocer más de un antígeno distintos<sup>92,93</sup>:

- CAR bi-específico o en tándem el cual codifica para dos scFv distintos expresados en la misma molécula CAR por un solo vector.
- CAR bi-cistrónico que codifica para dos moléculas CARs distintas enteras en una misma célula.
- Co-administración de dos producciones de CAR distintos.

- Co-transducción de dos producciones virales distintas en una misma población celular. Este producto generará tres tipos celulares, dos con un solo CAR y uno co-expresando los dos CARs en una misma célula.



**Figura 7:** Esquema de los 4 modelos de CARs. Figura basada en el artículo Shah, et al.<sup>92</sup>

Por otro lado, nos encontramos con la citotoxicidad asociada a la terapia CAR que puede ser de dos tipos la llamada *on-target*, *off-tumor* y el síndrome de liberación de citoquinas.

La toxicidad *on-target*, *off-tumor* deriva de la especificidad de reconocimiento del antígeno diana. El primer paso para diseñar un CAR es decidir cuál será el antígeno por reconocer, el antígeno diana debería cumplir una serie de requisitos: estar ampliamente expresado en la población tumoral, si es posible, ser vital para su supervivencia y tener una expresión restringida en el resto de las células y tejidos. Si el antígeno no tiene limitada su expresión a la población tumoral los pacientes pueden padecer toxicidad asociada al efecto citotóxico del CAR frente al reconocimiento del antígeno en la población no diana, el nombrado efecto *on-target*, *off-tumor*. Esta toxicidad puede no ser grave, por ejemplo, en los pacientes tratados con un CAR anti-CD19, esta toxicidad causa aplasias de linfocitos B<sup>94,95</sup> que hace necesaria la indicación de transfusiones de inmunoglobulinas durante el tiempo que este activo el CAR. Otros casos donde esta toxicidad cursó de forma muy grave fue el

caso de la paciente tratada con CAR anti-HER2 para un cáncer de colon metastático que causó la muerte de la paciente a los 5 días tras la infusión del CAR por

reconocimiento del antígeno ERBB2 en las células epiteliales de pulmón y la liberación del síndrome de citoquinas correspondiente en el tejido<sup>96</sup>. Para evitar el efecto *on-target, off-tumor* se han seguido varias estrategias entre ellas, diseñar CARs con menos afinidad del scFv al antígeno, disminuir la dosis, cambiar la vía de administración del CAR o producir CARs inducibles<sup>97</sup>.

La segunda y más común citotoxicidad que suelen presentar los pacientes tras ser tratados con terapia CAR es el síndrome de liberación de citoquinas (CRS de sus siglas en inglés). Este síndrome se basa en una respuesta inflamatoria aguda masiva debida al reconocimiento del antígeno por parte de los CARs, su activación, proliferación y la posterior activación del resto de células del sistema inmune<sup>98</sup>. El CRS suele ocurrir a las pocas horas-días (1-14 días) tras la infusión de los CARs. Hay varios grados de CRS des de leve con dolor de cabeza o fiebre hasta grave pudiendo conllevar la muerte del paciente, para saber el grado de CRS existe una guía (Tabla 3) basada en signos clínicos para facilitar el tratamiento del paciente rápidamente en caso que sea necesario<sup>99</sup>. La mayoría de los pacientes suelen tener un grado bajo-medio de CRS con fiebres y mialgias que suele remitir sin mayor complicación. Sin embargo, también hay pacientes con un CRS de mayor grado que presentan hipotensión, coagulopatías, neurotoxicidad pudiendo llegar a un fallo orgánico e ingresar en la UCI.

La citoquina IL-6 se eleva rápidamente tras la infusión de los CARTs si el paciente presenta el CRS a las pocas horas, días de la infusión, por tanto, para mediar el CRS está indicado el uso de tocilizumab un anticuerpo antagonista del receptor de la IL-6, también el uso de corticosteroides sin excluir todos los cuidados necesarios para tratar los síntomas que presente el paciente. Sin embargo, hay más citoquinas elevadas como IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-5, IL-8<sup>99</sup>.

Grado	Toxicidad	Tratamiento
<b>Grado 1</b>	Fiebre, náuseas, fatiga, dolor de cabeza, mialgias, malestar.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mantenimiento de fluidos vía intravenosa para hidratación.</li> <li>• Antibióticos en caso de infección.</li> <li>• Tratamiento convencional para disminuir la temperatura.</li> <li>• Evitar inmunosupresores y esteroides.</li> </ul>
<b>Grado 2</b>	Requerimiento de oxígeno <40%, hipotensión respondiendo a fluidos,	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tratar fiebre y síntomas como en grado 1.</li> </ul>

	bajo grado de vaso supresión o daño orgánico < grado 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mantener la presión sistólica &gt;90mmHg.</li> <li>• Obtener ecocardiograma e iniciar métodos de monitorización hemodinámicos.</li> <li>• Paciente con alto riesgo considerar tratar con tocilizumab.</li> </ul>
<b>Grado 3</b>	Requerimiento de oxígeno >40%, hipotensión alta, alto grado de vaso supresión, daño orgánico >2.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tratar los síntomas como en grado 2.</li> <li>• Tocilizumab +/- esteroides.</li> <li>• Vasosupresores.</li> <li>• UCI</li> </ul>
<b>Grado 4</b>	Requerimiento de ventilación mecánica o grado 4 de daño orgánico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• UCI</li> <li>• Manejo del paciente como en grado 3.</li> <li>• Ventilación mecánica.</li> <li>• Tocilizumab +/- esteroides.</li> </ul>
<b>Grado 5</b>	Muerte	

**Tabla 3:** Grados de CRS y manejo de las complicaciones asociadas según el Hospital Clínic basado en las indicaciones de Lee et al.<sup>100</sup> y Porter et al.<sup>99</sup>

### 3.3. CAR-T

La mayoría de los CARs son producidos en linfocitos T autólogos (CAR-T) para el tratamiento de enfermedades hematológicas o tumores sólidos, aunque también hay CARs sintetizados en otros tipos celulares como la subpoblación  $\gamma\delta$ T o células NK, explicadas con detenimiento en el apartado 3.4.

Los mejores resultados hasta la fecha se han obtenido con los CAR-T para neoplasias hematológicas, sobre todo los mayores éxitos se han obtenido con el CAR anti-CD19 para el tratamiento de leucemias y linfomas, estando ya aprobados dos productos CAR-T anti-CD19, Kymriah<sup>40</sup> y Yescarta<sup>101</sup> para LLA y DLBCL. Posteriormente a la diana CD19, los CARTs dirigidos frente a BCMA (antígeno de maduración de los linfocitos B, BCMA por sus siglas en inglés) para el tratamiento del mieloma múltiple han aparecido como la siguiente diana más prometedora estando ya en fases de ensayos clínicos muy avanzados<sup>102,103</sup>.

Por otro lado, cada vez hay más estudios preclínicos y ensayos clínicos con CAR-T para tumores sólidos, sobre todo en glioblastoma<sup>104,105</sup>, aunque sigue habiendo una falta de eficacia debido a varios factores como son<sup>106</sup>: el ambiente inmunosupresor del tumor,

la falta de persistencia de los CARs, una mayor toxicidad de los CAR-T debido a un efecto *on-target off-tumor*.

En ambos casos, la investigación en terapia CAR sigue creciendo, debido a los resultados positivos obtenidos y representar una opción real de nuevos tratamientos para muchos pacientes.

### 3.3.1. CAR-T en enfermedades hematológicas

Varias instituciones académicas o centros de investigación adheridos a hospitales fueron los principales impulsores de la terapia CAR, especialmente en la universidad de Pennsylvania (UPenn), el hospital Memorial Sloan-Kettering Center (MSKCC) y el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH). Estos tres centros publicaron hace prácticamente 10 años los primeros ensayos clínicos tratando pacientes con un CAR anti-CD19 para leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) o linfomas con distintos diseños y/o regímenes de acondicionamiento<sup>106</sup>. El antígeno CD19 está presente en la mayoría de las células de linaje B con excepción de las células plasmáticas y células madres hematopoyéticas. Por tanto, se expresa en alto grado en todo tipo de leucemias linfoides y LNH de célula B, sin tener teóricamente ningún efecto mieloablativo en otro órgano o tejido.

En estudios con CAR-T anti-CD19, el NIH y el MSKCC se decantaron por el dominio co-estimulador CD-28 mientras que UPenn escogió el 4-1BB que ha resultado ser la mejor opción a largo plazo, al menos, en el tratamiento de enfermedades hematológicas. En este sentido, Kalos et al.<sup>57</sup> y Porter et al.<sup>83</sup> demostraron que la adición del dominio de co-estimulación 4-1BB al CAR anti-CD19 confería a este una actividad muy superior respecto los CARs de primera generación, persistiendo un mínimo de 6 meses y obteniendo dos respuestas completas de los 3 pacientes con LLC avanzada incluidos en el ensayo clínico. Al mismo tiempo Brentjens et al.<sup>107</sup> publicaron sus resultados tratando pacientes con LLC y LLA con un CAR anti-CD19 con dominio co-estimulador CD28. Además, su comparación con o sin acondicionamiento quimioterapéutico, demostró que el acondicionamiento aumenta la persistencia y eficacia de la terapia. Kochenderfer et al.<sup>108,109</sup> fueron los primeros en mostrar resultados positivos obteniendo respuesta parcial tras la terapia CAR en un paciente de linfoma folicular recaído. Des de estos primeros ensayos clínicos ya hay más de 500 ensayos clínicos registrados basados en la terapia CAR-T.

Las dos únicas terapias CARs que han sido aprobadas por la agencia americana del medicamento (Food and Drug Administration, FDA) son los productos Kymriah (Tisagenlecleucel-T; CTL019) para tratar LLA de células B y Yescarta (Axicabtagene ciloleucel; KTE-C19) para el tratamiento de LNH, aprobadas el 30 de agosto de 2017 y

el 10 de octubre de 2017, respectivamente. Posteriormente, en 2019 ambos medicamentos fueron aprobados por la agencia española del medicamento (AEMPS), Kymriah para el tratamiento de pacientes pediátricos y adultos jóvenes hasta 25 años con LLA de células B refractaria, en recaída post-trasplante, o en segunda recaída o posterior, y de pacientes adultos con DLBCL recaído/refractario tras dos o más líneas de tratamiento sistémico, el 25 de Febrero de 2019<sup>40</sup>. Yescarta fue aprobado para el tratamiento de pacientes adultos con DLBCL o primario mediastínico de células grandes B, en recaída o refractario tras dos o más líneas de tratamiento sistémico, el 14 de octubre de 2019<sup>110</sup>.

Kymriah fue desarrollado en primera instancia por UPenn y luego vendido a Novartis. Los últimos resultados clínicos del producto Kymriah en una cohorte de 75 pacientes, niños y jóvenes hasta 25 años, con LLA recaídos o refractarios obtuvieron una respuesta general del 81% con un 60% de respuestas completas a los 3 meses y un 76% de respuesta general a los 12 meses tras infusión<sup>111</sup>. Por otro lado, Yescarta, el CAR anti-CD19 con el dominio co-estimulador CD28 desarrollado por el NIH fue vendido a KITE (Gilead). Los últimos resultados del producto Yescarta en el estudio ZUMA-1 para pacientes con DLBCL refractarios, mostraron con una media de 15,4 meses de seguimiento, que el 82% de los 108 pacientes obtuvieron una respuesta objetiva y un 58% una respuesta completa<sup>108</sup>.

### 3.3.1.1. CAR-T en Mieloma múltiple

Las células plasmáticas que causan el MM presentan varios antígenos en base a los cuales poder diseñar un CAR como son: CS1, CD138, CD38 o BCMA. El segundo CAR que ha demostrado mejores resultados hoy en día, después del CAR anti-CD19 para leucemias y linfomas, es el CAR anti-BCMA para el tratamiento del MM.

BCMA es una glicoproteína transmembrana que está expresada en la mayoría de los linfocitos B maduros y células plasmáticas en mayor o menor rango de expresión. BCMA es la proteína 17 de la superfamilia de receptores de necrosis tumorales (tumor necrosis factor receptor, TNFRSF17 de sus siglas en inglés)<sup>112</sup> y sus ligandos son BAFF (B-cell activating factor) y APRIL (*proliferation-inducing ligand*). La sobreexpresión de BCMA está asociado a una progresión del MM, ya que su expresión aumenta la regulación de las vías de señalización NF Kappa-B (*nuclear factor kappa-B*) activando genes de supervivencia y proliferación<sup>113,114</sup>. Además, su expresión en otros tejidos es mínima<sup>115</sup>. Por tanto, no debería causar citotoxicidad debido al efecto “on-target, off-tumor” en los pacientes, de hecho, en los ensayos clínicos probado no se ha detectado ninguna citotoxicidad específica causada por el antígeno BCMA<sup>115</sup>.

En 2013 se publicó el primer artículo de preclínica dónde estudiaron la expresión de BCMA en los distintos tejidos y células del cuerpo humano y comprobaron que el antígeno BCMA está estrictamente expresado en las células plasmáticas, no detectaron expresión en el resto de los tejidos ni en las células madres hematopoyéticas (CD34+)<sup>115</sup>. Además, los resultados *in vitro* demostraron que un CAR anti-BCMA tiene capacidad citotóxica frente a las células de MM. Por tanto, tras ese primer artículo, en 2016 se publicaron los primeros resultados de un ensayo clínico usando un CAR anti-BCMA-CD28CD3z para el tratamiento del MM<sup>116</sup>. Los resultados fueron bastante prometedores, los 12 pacientes incluidos en el ensayo fueron distribuidos en 4 grupos para recibir distintas dosis:  $0,3 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  y  $9 \times 10^6$  células +CAR-T/Kg. Los pacientes de los primeros dos grupos de dosis obtuvieron respuestas limitadas pero dos pacientes del 3º y 4º grupo con dosis mayores obtuvieron dos muy buenas respuestas parciales, más un paciente con respuesta completa durante 17 semanas (4º grupo). En cuanto a toxicidades, los pacientes que recibieron dosis bajas de CARs no tuvieron grandes citotoxicidades, un grado medio-bajo de CRS, mientras que los pacientes de mayores dosis tuvieron grado 3-4 de CRS. Un estudio posterior a este primero, demostró que la dosis mínima de CART BCMA para obtener respuestas son  $150 \times 10^6$  células +CAR, obteniendo un 94% de respuestas objetivas y un 56% de respuestas completas <sup>117</sup>. En este ensayo el dominio co-estimulador CD28 fue intercambiado por el 4-1BB y el CAR anti-BCMA se denominó bb2121 (propiedad de Bluebird Bio. Celgene).

Tras esos dos primeros estudios, varios modelos distintos de CAR anti-BCMA y ensayos clínicos se han ido sucediendo en el tiempo.

En preclínica, la tendencia al igual que en el resto de los diseños CARs para otras enfermedades, ha sido ir desarrollando cada vez más CARs anti-BCMA con el scFv humanizado<sup>118,119</sup> o directamente el scFv humano<sup>77</sup>, para evitar la posible respuesta inmunogénica del sistema inmune frente a la secuencia murina/artificial de la parte extracelular. Este mismo año 2020 se ha publicado el primer artículo en CARs, dónde el dominio de reconocimiento del antígeno BCMA consiste solo en la región humana de la cadena variable pesada (IgH) sin necesidad de la cadena ligera(IgL)<sup>120</sup>. Los resultados publicados demuestran que un CAR que codifica sólo para la IgH, en vez, de la IgH+IgL unidas mediante un *linker* tiene la misma actividad citotóxica si el dominio co-estimulador es el 41BB. La eliminación de la IgL y el *linker* puede suponer una mejora importante en el diseño de los CARs bicistrónicos o duales ya que debido al aumento de receptores y/o información codificante, a veces, el vector completo es de gran tamaño (Kb) siendo difícil de empaquetar en una molécula viral. Además, sin

el *linker*, se evita introducir una secuencia artificial que puede causar inmunogenicidad en el paciente.

Todos los estudios realizados a nivel pre-clínico apoyan el desarrollo de distintos ensayos clínicos. Actualmente, hay más de 20 ensayos clínicos abiertos para probar algún producto CAR anti-BCMA en pacientes con MM. Algunos estudian la combinación del CAR con o sin la adición de lenalidomida (NCT04133636, NCT03070327). Los cuatro ensayos clínicos más avanzados son el JNJ-4528 (Janssen) en EEUU<sup>121</sup> y su correlativo BM38 (Celyan Therapeutics) en China<sup>122</sup>, el bb2121 (bluebird bio)<sup>123</sup> y el JCARH125 (Juno Therapeutics). Se muestra la comparativa de resultados en la tabla 4. Los dos primeros ensayos usan el mismo CAR anti-BCMA con dos sitios de unión para el antígeno BCMA confiriendo una mayor afinidad al CAR, mientras que el tercero son los últimos resultados actualizados del primer ensayo clínico para CART-BCMA. Además del ensayo bb2121 hay otro ensayo en expansión el bb21217 (NCT03274219) con el mismo CART anti-BCMA pero tratando los linfocitos CART con un inhibidor del PIK3 (phosphoinositide 3 kinase inhibitor) durante su expansión para conseguir un fenotipo más de memoria, que en principio incrementará la persistencia y la potencia del CART<sup>124</sup>. Por ahora, de los 7 pacientes tratados, hay una respuesta objetiva del 86% (1 CR, 3VGPR, 2PR). En el MSCKCC tienen tres productos CARTBCMA, MCARH171, JCARH125 y el FCARH143, los tres con el scFv humano y el 4-1BB como dominio co-estimulador que están siendo desarrollados por Juno/ Celgene. El MCARH171 contiene un scFv y un constructo gamma-retroviral distinto mientras que el JCARH125 y el FCARH143 son exactamente el mismo CAR y solo difiere el proceso de manufacturación<sup>125</sup>.

También hay ensayos clínicos como el NCT03196414 en el que han estudiado la infusión secuencial de un CAR anti-CD19 y un CAR anti-BCMA con una respuesta objetiva del 92% y un 40% de CR<sup>126</sup>. Además, otro ensayo clínico de UPenn con otro CART anti-BCMA comparan pacientes con o sin régimen de linfodepleción antes de la infusión de las distintas dosis del CAR, demostrando que el mejor grupo de pacientes es el tratado previamente con un régimen de linfodepleción y con una mayor dosis de CAR (1-5x10<sup>8</sup> células CART)<sup>127</sup>. Esta tesis ha realizado toda la preclínica necesaria para la realización del primer ensayo de un CAR BCMA humanizado en el Hospital Clínic de Barcelona (EudraCT code: 2019-001472-11).

Los resultados de los ensayos clínicos de CART-BCMA son positivos con un gran porcentaje de respuestas completas. Sin embargo, la mayoría de los pacientes acaban cayendo a largo plazo. Por tanto, es importante seguir investigando para mejorar la molécula CAR o buscar nuevos antígenos posibles para la terapia CART anti-MM.

	<b>CARTITUDE-1<sup>121</sup></b>	<b>LEGEND-2<sup>122</sup></b>	<b>Bb2121</b>	<b>EVOLVE</b>
<b>CAR-T</b>	JNJ-4528	LCAR-B38M	Bb2121	JCARH125
<b>Diseño</b>	2 epitopos BCMA-41BBz	2 epitopos BCMA-41BBz	BCMA-41BBz	Human EGFRt/BCMA-41BBz
<b>Desarrollado en</b>	NCT03548207 The second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University	NCT03090659 The second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University	NCT02658929 NIH	MSCKK
<b>Farmacéutica</b>	Janssen	Cellyan Therapeutics	Bluebird Bio	Juno Therapeutics
<b>Dosis</b>	1 infusión 0,5-1x10 <sup>6</sup> CART/Kg	0,5x10 <sup>6</sup> CART/kg (0,07-2,1x10 <sup>6</sup> ) repartido en 3 infusiones (nº total 3,3-126,2x10 <sup>6</sup> , media 32,3x10 <sup>6</sup> )	50-150-450-800x10 <sup>6</sup> CART	50-150-450x 10 <sup>6</sup> CART
<b>Tratamiento previo</b>	5(3-16) refractarios a dos: IP, IMIM, Ab anti-CD38	3(1-9) incluyendo mínimo IP y/o IMIM	7(3-14) refractarios a: IP, IMIM.	7 (3-23)
<b>Nº pacientes</b>	25	57	33	44
<b>Acondicionamiento</b>	Flu-Cy	Cy	Flu-Cy	Flu-Cy
<b>Media edad</b>	61 (50-75)	54 (27-72)	60 (37-75)	62 (36-79)
<b>Respuesta</b>	91% (4 rCR, 2 CR, 7 VGPR, 6 PR)	88% (68% CR, 5% VGPR, 14% PR)	85% (45% CR, pero 6 de las 15 CR han recaído)	82% (48% VGPR)
<b>CRS</b>	88% (80% G1-2, 4,5% G3, 4,5% G5)	90% (47% G1 35% G2 y un 7% G3)	76% (70% G1-2 6% G3)	80% (71% G1-2, 9% G3)
<b>Expresión BCMA</b>	Disminución durante tratamiento. Preferencia población CD8+ fenotipo de memoria	No ven correlación entre los pacientes con menor (<40%) o mayor (>40%) expresión de BCMA	En la etapa de aumento de dosis: mínima expresión del 50% BCMA.	La actividad del CAR se mantiene incluso con niveles altos de BCMA soluble

**Tabla 4:** Comparativa de los últimos resultados de los ensayos clínicos

Además de estos estudios clínicos con CARTs anti-BCMA, se están analizando otros diseños de CARs y otros antígenos distintos a BCMA. Hay varios que combinan el reconocimiento del BCMA junto con otro antígeno, para disminuir la posible

evolución del tumor a BCMA negativo. Además, el BCMA es una proteína con expresión variable<sup>118</sup>. Lee et al.<sup>128</sup> diseñaron un CAR-APRIL dual que reconoce los antígenos BCMA y TACI eliminando las células que expresan tanto uno como otro antígeno. El antígeno CD138 es una glicoproteína que se expresa en las células plasmáticas y poblaciones de linfocitos y células mieloides, en este estudio NCT01886976<sup>129</sup> trataron a 5 pacientes con un CAR-antiCD138 demostrando que es una posible diana y segura, pero sin demasiada eficacia por el momento. Otro antígeno presente en las células plasmáticas es el antígeno CD38, pero desafortunadamente también se encuentra en otros tipos celulares como las NKs o los propios linfocitos T causando fratricidio. Para evitar este fenómeno añaden un anticuerpo o proteína CD38 durante la expansión del CART anti-CD38 para que se una al CAR evitando así el fratricidio de este<sup>129</sup>. En otro estudio han generado un CAR anti-CD38 con un gen suicida basado en una Caspasa 9 inducible evitando así su efecto citotóxico frente a las demás poblaciones hematopoyéticas<sup>129</sup>. Por último, otros antígenos como el CS1<sup>130</sup> con la adición de lenalidomida durante la expansión de los linfocitos para mejorar su actividad citotóxica o antígenos noveles como la integrina B7<sup>131</sup> o la proteína GPRC5D<sup>132</sup> también se están estudiando como posibles CARs para el tratamiento del MM.

### 3.1.1.2. CAR-T en Linfoma

Tal y como se ha mencionado previamente, el antígeno más ampliamente usado en la terapia CAR para LNH y que mejores resultados ha dado es el CAR-T anti-CD19, especialmente en DLBCL con una respuesta general mayor de un 50%<sup>108,133</sup>. El antígeno CD19, es una proteína que regula la activación dependiente de antígeno de los linfocitos B y suele estar presente en todos los subtipos de LNH. Los pacientes con LF, el segundo LNH más frecuente, también se han beneficiado de la terapia CAR anti-CD19. En el estudio de Schuster et al.<sup>133</sup> de los 14 pacientes con LF tratados, el 71% consiguieron respuestas completas y en el estudio de Turtle et al.<sup>134</sup> donde el ratio de CD4:CD8 era el mismo, de los 6 pacientes con LF un 40% respondieron al tratamiento, además, se administraron varios regímenes de acondicionamiento siendo la combinación Flu/Cy la que obtuvo mejores resultados.

Además del antígeno CD19 hay otros antígenos en estudio para el tratamiento de los distintos tipos de linfomas como el linfoma de manto, linfoma difuso, etc. Estos CARTs tienen como diana CD20<sup>135,136</sup>, CD22<sup>137</sup>, k light chain<sup>138</sup>, ROR1 (receptor-tyrosine-kinase-like orphan receptor 1)<sup>137</sup>, CD30<sup>139</sup>, CD37<sup>140</sup> y BCMA<sup>119,141</sup>. En detalle, en el ensayo clínico con un CAR anti-CD30 para el tratamiento del LH y el linfoma difuso anaplásico, que no expresan el antígeno CD19, el 14% de los pacientes obtuvieron respuestas completas de más de 2 años y el 43% enfermedad estable de forma

transitoria<sup>139</sup>. Los resultados in vitro con el CAR anti-CD22 confirman que los constructos que reconocen un antígeno proximal de la molécula CD22 tienen mayor actividad<sup>137</sup>. El CAR anti-k light chain está diseñado para que reconozca tan solo la cadena ligera de los linfocitos B y por tanto podría usarse en LNH, CLL y MM, de hecho en el ensayo trataron a 9 pacientes con LNH o CLL de los cuales 2 entraron en remisión completa tras 2-3 infusiones de CARs, 1 paciente en remisión parcial y de los 7 pacientes con MM 4 tuvieron enfermedad estable durante 2-17 meses<sup>137</sup>. ROR1 está presente en varias neoplasias epiteliales y linfáticas y tiene un papel en la supervivencia del tumor. Se expresa en las células B precursoras y en niveles bajos en adipocitos, páncreas y pulmón. En un estudio realizado en macacos comprobaron que los niveles de expresión de ROR1 en los tejidos no malignos no era suficiente para causar ninguna toxicidad y si en cambio reconocía la médula ósea y nódulos linfáticos<sup>137</sup>.

Los tres estudios con productos aprobados por la FDA o pendientes de aprobar para el tratamiento del DLBCL son ZUMA-1 también aprobado para el linfoma primario de mediastínico, JULIET (Kymriah desarrollado por NCI) y TRANSCEND (liso-cel pendiente de aprobar, del Fred Hutchinson cáncer Research Center) (Tabla 5).

	<b>ZUMA-1</b>	<b>JULIET-1</b>	<b>TRANSCEND</b>
<b>Nº pacientes</b>	108	93	73
<b>Producto</b>	Axicabtagene ciloleucel	Tisagenlecleucel	Lisocabtagene maraleucel
<b>Desarrollado en</b>	NCI	UPenn	SCH/FHCRC
<b>Farmacéutica</b>	Kite	Novartis	Juno
<b>Dominio co-estimulador</b>	CD28	4-1BB	4-1BB
<b>Ratio CD4:CD8</b>	variable	variable	1:1
<b>Acondicionamiento</b>	Flu-Cy	Flu-Cy o Benda	Flu-Cy
<b>Media de edad</b>	58	56	59
<b>ORR</b>	83%	52%	80%
<b>Respuestas completas</b>	58%	40%	59%
<b>CRS&gt; grado 3</b>	13%	22%	1%
<b>Neurotoxicidad&gt; grado 3</b>	31%	12%	13%

**Tabla 5**<sup>136</sup>: Estudios CAR anti-CD19 aprobados o pendientes de aprobar por la FDA para el tratamiento del linfoma.

## 3.2. CAR-NK

### 3.2.1. Célula Natural killer (NK)

Las NK son leucocitos granulares grandes<sup>43</sup> del sistema inmune innato que tienen la

capacidad de ejercer una función inmunoreguladora y citotóxica frente a células diana sin previa sensibilización<sup>142</sup>. Aproximadamente constituyen entre el 10-15% de los linfocitos en sangre periférica<sup>143</sup>, expresan los marcadores CD16 y CD56 constitutivamente y son negativas para CD3. Las NK en base a los marcadores CD16 y CD56 se subdividen en dos poblaciones, la población CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup> que son células mayoritariamente productoras de citoquinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , GM-CSF, IL-10 o IL-13 y corresponden alrededor del 10% del total de NK<sup>143</sup>. Esta población además del receptor de la IL-2 (IL-2R $\beta\gamma$ ) también expresa el receptor de alta afinidad IL-2R $\alpha\beta\gamma$ , el receptor c-Kit tirosina quinasa y moléculas de adhesión como CCR7 (receptor 7 de quimiocina-CC) y CD62L importantes para la infiltración de las células inmunes en los órganos linfoides secundarios. Por otro lado, la población CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>+</sup> no expresan ni el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ , ni c-Kit, ni las moléculas de adhesión CCR7 y CD62L, pero si otras moléculas de adhesión importantes como LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen 1*) y PENS<sup>143</sup>. Además, este subgrupo presenta un alta actividad citolítica debido a la respuesta citotóxica mediada por anticuerpo (ADCC del inglés) vía el receptor CD16 (Fc $\gamma$ RIII)<sup>144,145</sup>.

### 3.2.2. Citotoxicidad

La activación de las NK no es específica de antígeno, sino que esta mediada por una serie de receptores activadores o inhibidores de superficie. La actividad intrínseca citotóxica de las NK requiere de una inhibición para evitar el ataque a las propias células del organismo. Esta inhibición se basa en la interacción de sus receptores inhibidores mayoritariamente los KIRs (*Killer immunoglobulin (Ig)-like receptors*) con el HLA-I que prácticamente expresan todas las células nucleadas del organismo. Las células que carecen de estas moléculas o que presentan alteración en su HLA son reconocidas y eliminadas por parte de las NK<sup>54</sup>. Además, las células NK presentan otras familias de receptores inhibidores y activadores que también modulan su respuesta al interactuar con sus ligandos en la célula diana. Por tanto, la respuesta citotóxica de las NK frente a una célula dependerá del balance entre los receptores y ligandos de activación e inhibición<sup>43</sup>.

Destacan tres grupos de receptores de las NK: los KIRs (Killer immunoglobulin(Ig)-like receptors del inglés) que reconocen las moléculas CMH de tipo I clásicas (HLA-A, -B, -C), los receptores tipo C-lectina que reconoce las moléculas de CMH tipo I no clásicas<sup>70</sup> como el NKG2D y los conocidos como receptores naturales de citotoxicidad (NCR) entre ellos NKp46, NKp44 y NKp30<sup>146</sup>.

Los KIRs constituyen una familia de receptores inhibidores y activadores (Tabla 6). Se diferencian entre ellos por su estructura extracelular de 2 o 3 dominios tipo IgG y la longitud de sus colas citoplasmáticas. Los receptores con colas largas contienen dominios ITIM (inmunoreceptor basado en los motivos de inhibición tirosina) que suelen ser inhibidores al presentar unos dominios con motivos de inhibición basados en tirosinas, mientras que, las cortas presentan dominios activadores ITAM (inmunoreceptores con dominios activadores de tirosina) y activan las NK<sup>143</sup>. Cada KIR reconoce una serie de moléculas del HLA-I y cada persona tiene su propio genotipo de KIRs que interactúan con todas las moléculas de HLA-I presente en la membrana de todas las células nucleadas del organismo, cuando la expresión HLA-I está disminuida o las células no contienen el dominio HLA-I hay una falta de reconocimiento entre las moléculas KIR-HLA-I<sup>143</sup>. Las células en las que se produce esta falta de reconocimiento son por ejemplo aquellas infectadas por virus o células que presentan mutaciones debido a estrés celular o daño en el DNA que podrían transformarse en malignas y empezar el desarrollo de un tumor (Figura 8).

Los receptores tipo C-lectina comparten la subunidad CD94 y su actividad inhibidora o activadora se basa también en los dominios citoplasmáticos ITIM o ITAM respectivamente. Encontramos receptores activadores como el NKG2C, NKG2E e inhibidores como el NKG2A. También pertenece a esta familia el receptor activador NKG2D<sup>147</sup>, aunque no está unido al CD94 ni presenta ninguna cola ITAM. Su activación se basa en la señalización mediante la proteína DAP10 que recluta PI3K y este una vez fosforilado induce la citotoxicidad. Este receptor es menos probable que se inhiba mediante KIRs u otros receptores de tipo C-lectina porque no comparte las mismas vías de señalización. Sus ligandos son MICA, MICB (MHC class I chain-related) y ULBP (human citomegalovirus UL16 binding protein) que están expresados en células en condiciones de estrés o peligro, como son las células tumorales<sup>148</sup> (Figura 8).

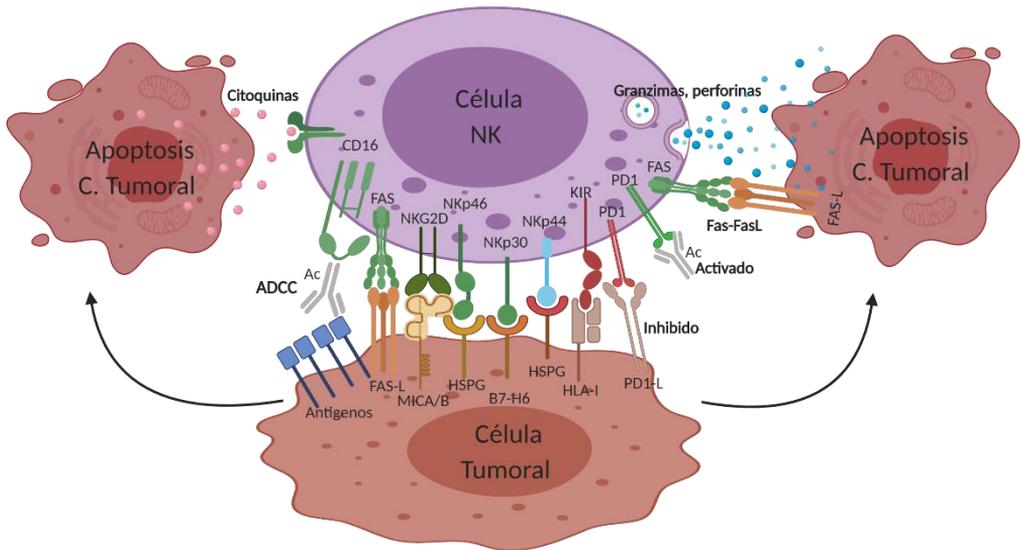
Tipo	Nombre KIR	Ligando HLA
Inhibidor	KIR2DL1	HLA-C G-2
Inhibidor	KIR2DL2	HLA-C G-1, HLA-C G-2, HLA-B
Inhibidor	KIR2DL3	HLA-C G-1, HLA-C G-2, HLA-B
Inhibidor	KIR3DL1	HLA-B, HLA-A
Inhibidor	KIR3DL2	HLA-A
Inhibidor	KIR3DL3	Desconocido

<b>Inhibidor</b>	KIR2DL5A	Desconocido
<b>Inhibidor</b>	KIR2DL5B	Desconocido
<b>Activador</b>	KIR2DL4	HLA-G
<b>Activador</b>	KIR2DS1	HLA-C G-2
<b>Activador</b>	KIR2DS2	HLA-C G-1
<b>Activador</b>	KIR2DS3	HLA-C G-1
<b>Activador</b>	KIR2DS4	HLA-C G-1, G-2
<b>Activador</b>	KIR2DS5	Desconocido
<b>Activador</b>	KIR2DS1	HLA-Bw4

**Tabla 6:** Receptores KIR activadores e inhibidores y sus correspondientes ligandos HLA<sup>149</sup>.

Los receptores naturales de citotoxicidad son receptores tipo I transmembrana e incluyen NKp46 (*NCR1*), NKp44 (*NCR2*), NKp30 (*NCR3*) que juegan un importante papel en el reconocimiento y citotoxicidad por parte de las NK de las células tumorales o infectadas (Figura 8). Estos receptores se unen a múltiples ligandos sobre todo sobre-expresados en células bajo niveles de estrés, por ejemplo NKp30 se une al ligando B7-H6 expresado únicamente en células tumorales<sup>150</sup>. El receptor NKp30 y el NKp46 son activadores mientras que el receptor NKp44 puede tener ambas funciones de activación o inhibición de las células NK ya que contiene dominios tanto ITIMs como ITAMs<sup>151,150</sup>.

En resumen, cuando el balance entre los receptores resulta en la activación de las NK, estas inducen la apoptosis de las células diana mediante tres tipos de muerte celular: la liberación de gránulos citotóxicos de perforina y granzimas al espacio intercelular, la activación de la vía Fas-FasL, donde el receptor Fas en la NK se une a su ligando FasL en la célula diana activando señales de apoptosis o la liberación de citocinas como el IFN- $\gamma$  que median la activación de la respuesta inmune adquirida<sup>54,152</sup>.



**Figura 8:** Receptores activadores e inhibidores de las NK y su respuesta citotóxica frente a las células tumorales. Los receptores mayoritariamente activadores de la citotoxicidad están en verde, los inhibidores en rojo y los que tienen ambas funciones por igual en azul. ADCC: respuesta citotóxica mediada por anticuerpo. Ac: anticuerpo. HSPG: heparán sulfato proteoglicano. Figura basada en el artículo Gonzalez-Rodriguez, et al.<sup>153</sup>

La inmunoterapia con células NK pretende aprovechar todas las vías de citotoxicidad presentes en las NK para redirigirlas o acentuar su actividad frente a las células tumorales (Figura 8), por ejemplo activar la respuesta ADCC que ejercen las NK frente a las células tumorales mediante el uso de anticuerpos monoclonales como el rituximab o la alo-reactividad que presentan las NK frente a las células del paciente cuando hay una disparidad entre KIR-HLA-I o ausencia de HLA-I<sup>153,154,155</sup>. Las células NK también pueden ser inhibidas mediante los *immune checkpoints*, por tanto, inhibir mediante anticuerpos los receptores PD1, TIGIT o LAG3 presentes en NK entre otros o sus ligandos (PD-L1, PVR, FGL1) en las células tumorales es otra inmunoterapia que produce la reactivación de las NK<sup>152</sup>.

### 3.2.3. CAR-NK

Existen varias fuentes de células NK para su uso en inmunoterapia, desde la línea tumoral NK-92 pasando por NK autólogas o alogénicas a NK de sangre de cordón umbilical o médula ósea, de células madre embrionarias o células inducidas pluripotentes<sup>144,156,157</sup>. Escoger una u otra fuente de NK dependerá del objetivo final de la terapia, según si se quiere que sea más a corto o largo plazo. Por ejemplo, las células NK-92 deben irradiarse previo a su administración, y por lo tanto su duración será limitada. Las NK alogénicas debido a la vida media de las NK obtenidas de sangre

periférica es probable que se agoten rápidamente tras eliminar las células cancerosas, mientras que las células NK más inmaduras como las derivadas de cordón o iPSC potencialmente perdurarán más tiempo en el torrente sanguíneo<sup>145</sup>.

Tras el éxito de la terapia con células CAR-T se comenzó a estudiar la posibilidad de usar todas estas fuentes de células NK para la creación de nuevos CARs debido a una serie de cualidades que presentan las NK frente los linfocitos T:

- Posibilidad de usar células NK alogénicas sin compatibilidad del HLA. Estas NK alogénicas en las que hay una disparidad KIR-HLA-I, eliminan la leucemia sin causar EICH en el paciente<sup>154</sup>.
- Activación de las NK sin previa sensibilización al antígeno<sup>158</sup>.
- Capacidad citotóxica sin reconocimiento de un antígeno específico<sup>70</sup>.
- Potencial producto *off-the-shelf*, es decir, permite tener una fuente de CAR-NK siempre disponible sin necesidad de usar las células del propio paciente<sup>158,70</sup>.
- Producción de un perfil de citosinas como IFN- $\gamma$ , IL-3 o GM-CSF distinto a las liberadas por los linfocitos T responsables del síndrome de liberación de citosinas<sup>144,159</sup>.
- Menor supervivencia en el paciente y por tanto una mayor seguridad por no producirse efectos *on-target*, *off-tumor* y/o aplasia de poblaciones celulares como los linfocitos B tras una terapia con CART-19<sup>160</sup>.

Del mismo modo, también presentan una serie de inconvenientes:

- Bajas eficiencias de infección con excepción de la línea NK-92 que obtiene eficiencias de infecciones más parecidas a los estándares de los linfocitos T<sup>160</sup>.
- En algunos casos el método de expansión requiere la necesidad de co-expandir las células NK con líneas tumorales irradiadas que se usan como células presentadoras de antígeno.
- Irradiación de la línea tumoral NK92.
- Inhabilidad de llegar a tumores sólidos y/o evitar el ambiente inmunosupresor<sup>144</sup>.
- Necesidad de administrar citosinas como la IL-2 exógenamente durante el periodo de tratamiento o diseño de constructos CARs con liberación de citoquinas<sup>70</sup>.

Entre 2012 y 2013 se empezaron a publicar los primeros resultados en preclínica con células CAR-NK. Por ejemplo, el grupo del Dr. Dario Campana publicó uno de los primeros estudios usando un CAR-NK para el receptor NKG2D con DAP10 como

dominio coestimulador permitiendo la sobre-activación de las NK mediante la señalización del CAR y aumentando la citotoxicidad de éstas frente a células leucémicas y tumores sólidos<sup>157</sup>. Posteriormente, otros estudios preclínicos fueron publicados, como un CAR-NK con NK de sangre periférica autóloga para c-MET contra el cáncer de hígado<sup>159</sup>, o células NK-92 contra el antígeno CD19<sup>161</sup>. Estos y otros estudios están mencionados en la tabla 7.

Fuente de NK	Antígeno	Enfermedad	Referencia
NK92	GD2	Neuroblastoma	162
NK92	CD5	T-ALL	163
NK92	CD20	CLL	161
NK92	CD19	ALL	161
NK92	ERbB2	Neuroblastoma	164
NK92	EGFR	Neuroblastoma	165
NK92	HER2	Cáncer de mama	166
NK92	CS1	Mieloma múltiple	167
NK92	CD138	Mieloma múltiple	168
YTS-NK	PSCA	Cáncer de próstata	169
CB-NK	CD19	ALL	170
NK (KHYG-1)	EGFRvIII	Glioblastoma	171
NK92	Anti- $\alpha$ FR	Cáncer de ovario	172
NK92	PD1	Tumor sólido	173

**Tabla 7:** Estudios de preclínica con células CAR-NK.

Sin embargo, los resultados obtenidos por el momento distan de parecerse a los conseguidos en la terapia CAR usando linfocitos T. Esta falta de resultado positivos puede deberse a los siguientes motivos: una desaparición demasiado temprana de los CAR-NK en los pacientes o el usar conformaciones típicas de linfocitos T para el diseño de los CARs en NK. Por tanto, los últimos estudios apuestan por rediseñar los CARs usando dominios coestimuladores propios de las NK como pueden ser DAP10 o 2B4<sup>174,175</sup> y la co-expresión de citoquinas que permiten una persistencia mayor de las NK como la IL-2 o IL-15<sup>170</sup>.

Los últimos resultados incluyen un CAR-GD2 con la subpoblación de NKT para neuroblastoma donde concluyen que la co-expresión de IL-15 con cualquiera de los dos dominios coestimuladores CD28 o 41BB incrementa el número absoluto de células CAR-NKT y además reduce los marcadores de agotamiento. Sin embargo, este estudio también demuestra que el dominio 41BB induce una excesiva activación obteniendo un número total menor de células NKT en comparación con el dominio CD28<sup>176</sup>.

Fate Therapeutics ha diseñado otro CAR-NK a nivel preclínico contra CD19 (FT596) a partir, de células NK derivadas de iPSC (*induced pluripotent stem cells*). Este CAR secreta IL-15 y CD16. La adición de CD16 confiere la posibilidad de combinar la terapia con fármacos tipo rituximab y aumentar la actividad citotóxica de las NK<sup>177</sup>.

#### Ensayos clínicos con administración de células CAR-NK

El primer ensayo de células CAR-NK haploidénticas fue llevado en el hospital de St. Jude (NCT00995137) para pacientes pediátricos con ALL contra CAR-CD19. Las NK fueron expandidas en co-cultivo con células artificiales presentadoras de antígeno K562-mb15-41BBL y IL-2.

El primer ensayo clínico (NCT02944162) usando células NK-92 fue en pacientes con leucemia mieloide aguda (AML) con un CAR-CD33<sup>178</sup>. Tras la infusión de  $5 \times 10^9$  CARNK anti-CD33 en tres pacientes y al no obtener una mejora en la enfermedad de más de dos meses en ningún caso el ensayo fue suspendido.

En 2020 se ha publicado el primer estudio en el que se administran CAR-NK de sangre de cordón umbilical para pacientes con linfoma<sup>179</sup>. En total 11 pacientes fueron incluidos en el ensayo clínico de los cuales 8 pacientes (73%) tuvieron una respuesta objetiva, de estos, 7 tuvieron una RC durante el primer mes de tratamiento. De los 11 pacientes, 5 tenían un *mismatch* KIR-ligand. Sin embargo, en este estudio no se han obtenido resultados concluyentes de la efectividad de las CAR-NK ni de la importancia o no del *mismatch* debido a la pequeña serie de pacientes, su fase de la enfermedad y otros tratamientos realizados posteriores a la administración de las CAR-NK.

A pesar de que ya hay varios ensayos clínicos en marcha con administración de células CAR-NK (Tabla 8), es necesaria más investigación pre-clínica en los próximos años para conseguir unos resultados óptimos en la terapia CAR-NK.

Nº estudio	Fuente NK	Diana	Enfermedad
NCT02944162	NK92	CD33	R/RAML
NCT00995137	NK haploidénticas expandidas con C9	CD19	ALL linaje B pediátrico
NCT02839954	NK92	MUC-1	R/R tumores sólidos positivos para MUC-1
NCT03056339	CB-NK expandidas con C9	CD19	ALL, CLL, NHL
NCT02742727	NK92	CD7	R/R leucemias y linfomas
NCT02944162	NK92	CD33-CD28, CD137	R/R CD33+ AML
NCT02892695	NK92	Cd19-CD28, 4-1BB	R/R ALL, CLL, FL, BCL, DLBCL
NCT03294954	NKT	GD2	neuroblastoma

**Tabla 8:** Ensayos clínicos basados en un CAR-NK.



# Hipótesis y objetivos



Las neoplasias hematológicas de células B, en concreto el MM y el LNH de célula B son enfermedades incurables o con un mal pronóstico después de una primera recaída, respectivamente. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de invertir en nuevas terapias que den más opciones de tratamiento a los pacientes. En los últimos años, la inmunoterapia se ha desarrollado exponencialmente dando lugar a nuevos tratamientos para distintas enfermedades.

En concreto, la terapia CAR se ha posicionado como una nueva terapia con grandes resultados en neoplasias hematológicas, especialmente el CAR-antiCD19 para LLA. Sin embargo, uno de los principales problemas de esta terapia es la pérdida temprana del CAR produciendo recaídas de la enfermedad, que podría deberse a la reacción inmunológica frente a los CARs de origen murino. Además, los linfocitos T autólogos tras varias líneas de tratamiento pueden no estar en condiciones óptimas para la terapia CAR, recientemente han aparecido las células NK como fuente alternativa de células inmunes en la terapia CAR que podrían usarse de forma universal. Sin embargo, los primeros resultados en preclínica y clínica no son los esperados, debido a la dificultad de modificar las NK y la necesidad de citoquinas para su proliferación.

### **Primer estudio**

Las células de MM expresan en su membrana el antígeno BCMA que se expresa únicamente en las células B maduras, y actualmente hay varios ensayos clínicos que han demostrado la eficacia del tratamiento. Hipotetizamos que el diseño y desarrollo de un CART-antiBCMA humanizado podría evitar la pérdida temprana del CAR en pacientes y convertirse en una nueva terapia a ofrecer des de una institución pública.

Objetivos específicos:

1. Diseñar un CARTBCMA académico para el tratamiento del MM en una institución pública.
2. Humanizar el CARTBCMA y comparar la actividad y eficacia del CART BCMA murino y su versión humanizada.
3. Estudiar el efecto del BCMA soluble y su inhibición en la terapia CARTBCMA para MM.
4. Realizar toda la preclínica necesaria para el desarrollo del ensayo clínico multicéntrico.

## Segundo estudio

Los linfocitos T usados en la terapia CAR son autólogos para evitar el desarrollo de la EICH mientras que las células NK derivadas de sangre de cordón umbilical (CB-NK) pueden ser alogénicas porque no causan EICH favoreciendo su uso. Además, las células NK presentan una citotoxicidad intrínseca frente a las células tumorales sin necesidad de reconocimiento del antígeno diana. Sin embargo, las células NK, por sus propiedades biológicas, parecen ser más difíciles de transducir con lentivirus. Hipotetizamos que la actividad anti-LNH de las NK *per se* o de un CAR-NK de células de cordón umbilical es comparable a la actividad citotóxica de un CART.

Objetivos específicos:

1. Diseñar un método eficiente para la transducción de células CB-NK con un CAR.
2. Estudiar la actividad y eficacia de un CARNK frente a CD19 (CARNK19) para el tratamiento del LNH.
3. Comparar la actividad y eficacia de células CART19 vs células CARNK19 y su combinación para el tratamiento del LNH.

# Material y métodos



## 1. Líneas celulares

Las líneas RPMI8226, U266 y ARP1 fueron usadas para el estudio de mieloma múltiple (MM) y la línea Ramos (linfoma de Burkitt, del inglés BL) para el estudio de Linfoma No Hodgkin. La línea K562 (leucemia mieloide crónica, del inglés CML) se utilizó como control negativo de las dos enfermedades.

Todas las líneas celulares, a excepción de la línea ARP1 (cedida amablemente por el “Multiple Myeloma Research Center” de Little Rock, Ak, USA), fueron adquiridas en la “American Tissue Culture Collection” (ATCC). Todas fueron cultivadas con medio RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) con un 10% suero bovino fetal (FBS) (Sigma-Aldrich, Merck) previamente des-complementado mediante choque térmico (56°C durante 30 min) y un 1% de Penicilina/Estreptomicina (Sigma-Aldrich, Merck) con excepción de la línea U266 que fue cultivada con un 15% de FBS.

La línea HEK293T fue utilizada para la producción viral cultivada con “Dulbecco’s modified Eagle medium” (DMEM) con un 10% de FBS y un 1% de Penicilina/Estreptomicina.

## 2. Clonajes

Los vectores usados durante el transcurso de esta tesis fueron:

Vectores clonados	Método
<b>pCCL_EF1<math>\alpha</math>_mBCMA-CD8a-41BB-CD3<math>\zeta</math></b>	Inserto mBCMA diseñado y amablemente cedido por el Dr. Amer Najjar. Digerido y posteriormente ligado en pCCL_Ef1 $\alpha$ _CD19-CD8a-41BB-CD3 $\zeta$ .
<b>pCCL_EF1<math>\alpha</math>_hBCMA-CD8a-41BB-CD3<math>\zeta</math> (Germline)</b>	Inserto hBCMA diseñado, digerido y posteriormente ligado en pCCL_EF1 $\alpha$ _mBCMA-CD8a-41BB-CD3 $\zeta$ .
<b>pCCL_EF1<math>\alpha</math>_hBCMA-CD8a-41BB-CD3<math>\zeta</math> (BLAST)</b>	Inserto hBCMA diseñado, digerido y posteriormente ligado en pCCL_EF1 $\alpha$ _mBCMA-CD8a-41BB-CD3 $\zeta$ .
<b>pCCL_EF1<math>\alpha</math>_CD19HA-CD8a-41BB-CD3<math>\zeta</math></b>	Inserto CD19HA diseñado, digerido y posteriormente ligado en pCCL_EF1 $\alpha$ _mBCMA-CD8a-41BB-CD3 $\zeta$ .
<b>pCCL_EF1<math>\alpha</math>_CD19HA-CD8a -NKG2D-2B4-CD3<math>\zeta</math></b>	Inserto NKG2D-2B4 diseñado, digerido y posteriormente ligado en pCCL_EF1 $\alpha$ _CD19HA-CD8a-41BB-CD3 $\zeta$ .
<b>pCCL_MSCV_CD19HA-CD8a-41BB-CD3<math>\zeta</math></b>	Inserto obtenido del vector pCCL_EF1 $\alpha$ _CD19HA-CD8a-41BB-CD3 $\zeta$ y del vector pLV_MSCV_Luc-T2A-GFP. Digerido y posteriormente ligado en pCCL_GK100 cedido amablemente por

	la Dra. Sonia Guedan.
<b>pCCL_MSCV_CD19HA-CD8a -NKG2D-2B4-CD3ζ</b>	Inserto obtenido del vector pCCL_EF1α_CD19HA-CD8a-NKG2D-2B4-D3ζ y del vector pLV_MSCV_Luc-T2A-GFP. Digerido y posteriormente ligado en pCCL_GK100 cedido amablemente por la Dra. Sonia Guedan.
<b>pLV_MSCV_Luc-T2A-GFP</b>	Inserto diseñado y amablemente cedido por el Dr. Amer Najjar
<b>pLV_MSCV_BCMA-GFP</b>	Inserto comercial (OriGene), digerido y ligado en pLV_MSCV_Luc-T2A-GFP.

**Tabla 9:** Plásmidos usados en el transcurso de esta tesis.

Todos los vectores usados tienen resistencia a ampicilina.

### 3. PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Se amplificaron mediante PCR los distintos fragmentos requeridos de los distintos plásmidos con la polimerasa Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) con un volumen final de 20 µl: 4 µl de tampón HF (1X), 0,4 µl de dNTPs (200 µM), 1 µl de cebador delantero (0,5 µM), 1 µl de cebador trasero (0,5 µM), 2 µl de DNA guía (1-10ng), 0,2 µl Phusion DNA Polymerase (1.0 unidad/ 50 µl PCR) y 11,4 µl H<sub>2</sub>O.

En el termociclador las reacciones fueron:

	Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización inicial</b>	98°C	30 s
<b>35 ciclos</b>	98°C	10 s
	55-65°C	30 s
	72°C	30 s por kb
<b>Extensión final</b>	72°C	10 min
<b>Mantenimiento</b>	4°C	Indefinido

### 4. Preparación de geles de agarosa para la electroforesis

La comprobación de las reacciones de PCR, la calidad del DNA y el aislamiento del DNA diana por peso molecular se realizaron en geles de agarosa. Para ello se diluyeron 0,5 g de Agarosa D1 LE (Condalab) en 50 ml de Tris/Acetic acid/EDTA (TAE) 1x (BIO-RAD) calentando la solución 2 min al microondas. Tras enfriar la solución se añadieron 5 µl de SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher) y se dejó solidificar el

gel. Todas las muestras a correr se mezclaron con el tampón de carga 10x BlueJuice Gel Loading Buffer (Invitrogen) añadiendo la escalera de peso molecular de DNA de 1 kb PlusLadder™ (Invitrogen).

Los productos de PCR y las bandas de geles seleccionadas se purificaron según el protocolo del kit comercial Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit (Invitrogen).

### 5. Digestión y ligación de vectores

Digestión: Los distintos vectores fueron digeridos con 1  $\mu$ l de las correspondientes enzimas de interés New England Biolabs y con el tampón CutSmart (1x) o Thermo Fisher con el tampón Tango (1x) o FastDigest (1x) añadiendo en todos los casos 1  $\mu$ g del DNA de interés y H<sub>2</sub>O hasta llegar al volumen adecuado (20-50  $\mu$ l). Según el protocolo de la casa comercial se dejó la digestión de (15 min a 16 h) de incubación a 37°C.

Enzima	Tampón	Digestión
<b>MlUI</b>	FastDigest (thermo Fisher)	5-15 min
<b>MreI</b>	FastDigest (thermo Fisher)	5-15 min
<b>Sall</b>	FastDigest (thermo Fisher)	5-15 min
<b>HindIII</b>	FastDigest (thermo Fisher)	5-15 min
<b>BamHI</b>	FastDigest (thermo Fisher)	5-15 min
<b>SmaI</b>	FastDigest (thermo Fisher)	5-15 min
<b>Kpn2I</b>	FastDigest (thermo Fisher)	5-15 min
<b>XbaI</b>	CutSmart (NEB)	15 min a 16 h
<b>SphI-HF</b>	CutSmart (NEB)	15 min a 16 h
<b>Sall-HF</b>	CutSmart (NEB)	15 min a 16 h
<b>BamHI-HF</b>	CutSmart (NEB)	15 min a 16 h
<b>NsiI-HF</b>	CutSmart (NEB)	15 min a 16 h
<b>XhoI</b>	CutSmart (NEB)	15 min a 16 h
<b>MluI-HF</b>	CutSmart (NEB)	15 min a 16 h
<b>NdeI</b>	CutSmart (NEB)	15 min a 16 h

**Tabla 10:** Enzimas de restricción usadas en los distintos clonajes para conseguir los vectores necesarios durante el transcurso de la tesis. NEB: New England BioLabs.

Ligación: La ligación de los distintos constructos se realizó siguiendo el protocolo de la T4 DNA Ligase (New England BioLabs) a un volumen final de 20  $\mu$ L (2  $\mu$ L tampón T4 DNA Ligase, 1  $\mu$ L T4 DNA Ligase, 0,020 pmol del DNA del vector, 0,060 pmol del DNA del inserto y H<sub>2</sub>O hasta 20  $\mu$ L). La ligación se realizó a temperatura ambiente durante

15 a 60 min para unir los extremos cohesivos. Para calcular la cantidad (ng) de inserto se usó la siguiente fórmula, usando siempre 50 ng de cantidad del vector.

$$\text{ng de inserto} = \frac{\text{Cantidad de vector (ng)} \times \text{Medida del inserto (Kb)}}{\text{Medida del vector (Kb)} \times \text{Relación (3:1)}}$$

## 6. Transformación en bacteria

Se usaron bacterias competentes para incorporar el DNA clonado mediante su transformación. Para la transformación de las bacterias con DNA de los vectores pCCL se usó la cepa One Shot™ TOP10 chemically competent E.coli (Thermo Fisher) y para la transformación de bacterias con DNA de vectores pLV se usó la cepa DH5α™ (Thermo Fisher). Primero se descongelaron 25 µl de bacterias competentes en hielo y tras descongelarse en hielo se añadieron 5 µl de DNA del producto de ligación y se incubaron en hielo entre 10-20 min. Después se realizó un choque térmico a 42 °C 1 min y se incubó 5 min en hielo. Por último, se añadieron 200 µl de medio SOC, se incubó de 30 a 60 min en el termobloque a 37 °C y se sembraron las bacterias transformadas en una placa de LB con resistencia a ampicilina (Sigma-Aldrich) en una estufa a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se picaron las colonias de bacterias y se pusieron a crecer con medio LB (2 ml) en una estufa a 37 °C toda la noche. Al día siguiente se extrajo el DNA de las bacterias, siguiendo el protocolo de PureLink™ Quick Plasmid MiniPrep Kit (Thermo Fisher) y se envió el DNA a secuenciar para comprobar que no hubiese ninguna mutación en toda la secuencia del constructo clonado (GATC Services, Eurofins Genomics).

## 7. Producción viral

Todos los virus producidos en el laboratorio fueron vectores lentivirales de segunda o tercera generación.

Se usaron vectores de segunda generación para producir el virus para expresar el reportero “green fluorescent protein- FireFly-luciferase” (GFP-FFLuc) en las distintas líneas celulares y para sobre-expresar la proteína BCMA unida a GFP (BCMA-GFP). Los vectores de empaquetamiento usados en la producción viral de un vector lentiviral de segunda generación son:

pMD2.G: plásmido empaquetador que codifica para la proteína lentiviral VSV-G.

psPAX2: plásmido empaquetador que codifica para las proteínas lentivirales gag y pol.

Se usaron vectores de tercera generación para producir los virus que expresarán los distintos CARs en los linfocitos T y células NK. Los vectores de empaquetamiento para la producción lentiviral de tercera generación son:

pMD2-VSV-G: plásmido empaquetador que codifica para la proteína lentiviral VSV-G.

pMDLg-pRRE: plásmido empaquetador que codifica para las proteínas lentivirales gag y pol.

pRSV-Rev: plásmido empaquetador que codifica para la proteína lentiviral REV.

El protocolo para la producción de virus fue el mismo tanto si los vectores eran de segunda o tercera generación.

#### Día 0:

Aspirar el medio de las 293-T, lavar con PBS y añadir 3 ml de Tryplex (Gibco by Life Technologies). Tras 5 min de incubación a 37 °C añadir 7 ml de medio, recoger las células y centrifugar a 1.500 rpm 5 min. Aspirar el medio y repartir las células en distintas placas de 10 cm a  $5 \times 10^6$  células/placa para su posterior transfección. Añadir 7 ml de medio DMEM/placa.

#### Día 1:

<b>2ª generación (1 placa)</b>	<b>3ª generación (1 placa)</b>
Eppendorf A: 500 $\mu$ L NaCl + 14 $\mu$ L Jetpei (Polyplus transfection) Eppendorf B: 500 $\mu$ L NaCl + 1,5 $\mu$ g pMD2.G+ 4 $\mu$ g psPAX2+ 5 $\mu$ g Vector X a transfectar	Eppendorf A: 500 $\mu$ L NaCl + 20 $\mu$ L Jetpei (Polyplus transfection) Eppendorf B: 500 $\mu$ L NaCl + 1,70 $\mu$ g pMDLg-pRRE + 2 $\mu$ g pMD2-VSV-G + 3,41 $\mu$ g pRSV-Rev + 6,9 $\mu$ g Vector X a transfectar

Hacer un vórtice y centrifugar 1 min. Pasar el volumen del tubo con Jetpei (eppendorf A) al tubo del DNA (eppendorf B). Hacer un vórtice, centrifugar 1 min e incubar a Tª ambiente de 15 a 30 min. Durante este tiempo aspirar el medio de las células 293T y poner 7 ml de medio DMEM. Pasado el tiempo de incubación repartir 1 ml de la mix en la placa de las 293T. Incubar las células a 37 °C durante 48 horas.

### Día 3:

Recoger el sobrenadante de las 293T. Centrifugar el sobrenadante durante 15 min a 2.500 rpm. Filtrar el sobrenadante con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y añadir el tampón LentiX (Takara) a una ratio LentiX: sobrenadante (1:3). Mezclar suavemente sin producir burbujas y dejar entre 30 min y 1 semana a 4 °C.

Centrifugar el virus a 1.500 G durante 45 min a 4 °C, retirar el sobrenadante y resuspender el virus concentrado con medio para dejarlo aproximadamente 100 veces más concentrado. Hacer alícuotas de un solo uso y guardar a -80 °C.

## 8. Titulación del virus

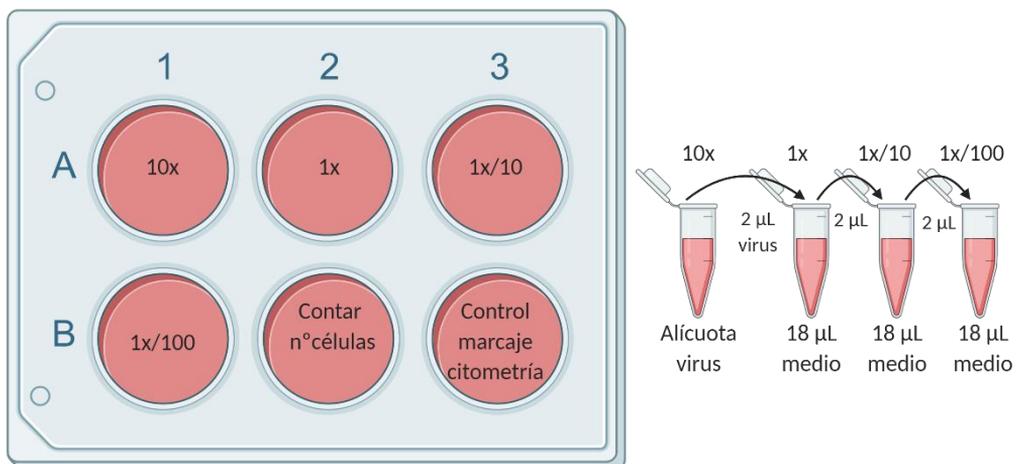
### Día 0:

Aspirar el medio de las células 293T, tripsinizar e incubar 5 min a 37 °C. Hacer un lavado a 1.500 rpm 5 min. Tras la centrifugación descartar el sobrenadante y repartir las células en una placa de 6 pocillos a  $2,5 \times 10^5$  células/ pocillo con 2 ml de medio DMEM en cada pocillo.

### Día 1:

Cambiar el medio (2ml) de los 6 pocillos de 293T y hacer el conteo de las células de un pocillo para tener el número inicial de células en el tiempo de infección. Este número será necesario más adelante para saber el título.

Descongelar una alícuota de virus (10x) y hacer 3 diluciones seriadas con un factor de dilución de 10 (1x, 1x/10, 1x/100). En el primer pocillo de 293T se añaden 10  $\mu\text{l}$  de virus inicial y en los siguientes pocillos los 10  $\mu\text{l}$  correspondiente la dilución seriada.



**Figura 9:** Dibujo explicativo para cuantificar el título viral.

Día 3:

Aspirar el medio de los 6 pocillos de 293T, tripsinizar añadiendo 200  $\mu\text{L}$  de Tryplex en todos y dejar incubando a 37 °C 5 min. Tras la incubación añadir 800  $\mu\text{L}$  de medio DMEM para resuspender las células y hacer un lavado de 5 min a 1.500 rpm. Tras el lavado proceder al marcaje de las células para saber el porcentaje de infección de cada pocillo de 293T por citometría.

El título del virus se calcula en base a la dilución que obtiene un porcentaje de infección entre 3 y 20%. Se escoge esta dilución porque cada célula infectada equivale a 1 partícula viral, y por tanto, siguiendo esta fórmula se calcula el número de partículas virales/  $\mu\text{L}$ :

$$\text{N}^\circ \text{ de partículas/ } \mu\text{L} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ células 293T plaqueadas}) * \left(\frac{\text{n}^\circ \text{ células positivas}}{100}\right)}{\mu\text{L de virus utilizados}}$$

Para las células T usamos una MOI (multiplicidad de infección) de 10 partículas virales/ cel.

$$\text{Virus } \mu\text{L: } \frac{\text{n}^\circ \text{ células} \times \text{MOI p.virales/cel}}{\text{n}^\circ \text{ p.virales/}\mu\text{L}}$$

### 9. Obtención y selección de células CAR-T

Los linfocitos T se obtuvieron de capas leucocitarias de donantes sanos obtenidos del Banc de Sang i Teixits (BST) con previo consentimiento de su uso para la investigación. Los linfocitos se aislaron mediante la separación por gradiente de densidad, Ficoll (histopaque-1077 de Sigma-Aldrich), de las células mononucleadas y después se deplecionó la población de células T por separación magnética, se utilizaron las esferas magnéticas “Pan T cell” (Miltenyi Biotec). Tras el Ficoll y la selección magnética o bien se empezó la expansión de linfocitos T o se criopreservaron de 5 a  $10 \times 10^6$  de linfocitos T por crio-tubo hasta su uso en medio de congelación compuesto de FBS con un 10% de DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich).

Día 0:

Para cada expansión se descongela un vial de linfocitos T (5-10 millones de células por vial) en el baño a 37°C, añadiendo 9 ml de medio CLICKS (50% RPMI1640, 50% de medio Clicks (Irvine Scientific), 1% Penicilina/Estreptomicina, 0,5% Glutamina, 5% suero humano, SH) y se realiza un lavado a 1.500 rpm durante 5 min. Se cuentan las células con azul de tripano (Sigma-Aldrich) al microscopio y se resuspenden los

linfocitos T a una concentración de  $1 \times 10^6$ / ml en medio CLICKs con IL-2 (100UI) y “Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28” añadiendo 25  $\mu$ L de estas esferas magnéticas/  $1 \times 10^6$  de células. Previamente se lavan las esferas magnéticas necesarias con su tampón (PBS+ 0,5% BSA) añadiendo mínimo 1 ml de tampón a la solución de esferas magnéticas y se realiza un vórtice. Tras el contacto de la solución con el imán (Invitrogen) se extrae todo el volumen dejando las esferas unidas a la pared del tubo. Las esferas se separan del imán y se resuspenden con los linfocitos T.

Día 1-2 (día 1 si los linfocitos provienen de un Ficoll en fresco o día 2 si provienen de un crio-tubo respectivamente):

Infección linfocitos T: contar las células, resuspender a una concentración de  $2 \times 10^6$  células /ml en medio CLICKs y IL2 (100 UI) y sembrar 500  $\mu$ l en una placa de 24 pocillos. Añadir los  $\mu$ l de virus necesarios para una MOI 10 y polibreno (0,8  $\mu$ L/mL). Centrifugar 1 h a 2.000rpm.

Tras 6 a 16 horas lavar los linfocitos T para quitar el polibreno y resuspenderlos a una concentración  $1 \times 10^6$  células/ml.

Día 3-6:

Añadir medio CLICKS con IL-2 a demanda, siendo necesario si la concentración celular es mayor de  $2 \times 10^6$  células/ml.

Día 6-8:

Mirar la eficiencia de infección del CAR, si es superior del 20% proceder a realizar los ensayos pertinentes.

## 10. Detección de células CART

Primero se extraen las esferas magnéticas del cultivo celular con el imán y se pasan las células a tubos de citometría donde se lavan con FACS buffer (PBS + 2% FBS) a 1.500 rpm durante 5 min. Para la tinción, cada muestra se incuba con 500 ng de proteína BCMA: Fc recombinante, (Enzo Life Sciences) durante 30 min en hielo. Tras un lavado con FACS buffer a 1.500 rpm durante 5 min, se añade el anticuerpo secundario conjugado human IgG Fc-specific V421 (Biolegend), incubando durante 15 min a T<sup>a</sup> ambiente. Se realiza un último lavado y se fijan las células con 1% de paraformaldehído (PFA). La lectura del marcaje se realiza por citometría de flujo (FACS CANTO II, Becton Dickinson) y se analiza con el programa FlowJo v.7.6.5.

### 11. Obtención y diferenciación de macrófagos

Se obtuvieron macrófagos a partir de la diferenciación de monocitos de capas leucocitarias de donantes sanos tras previo consentimiento de su uso para la investigación. La capa leucocitaria se dividió en dos partes, una para la obtención de linfocitos T previamente explicado en el punto 3.2.; y la otra parte para la obtención de monocitos que serán diferenciados a macrófagos. Los 10 ml de sangre que contenía la capa leucocitaria se mezclaron con 105 ml de PBS a temperatura ambiente + 2% FBS+ 1 mM EDTA (Fisher Scientific) y se repartieron 30 ml de esta mezcla en tubos de 50 ml (30 ml en cada tubo). Se añadió 1ml de RosetteSep Human Monocyte Enrichment Cocktail (Stem Cell Technologies) en la mezcla y se dejó incubar durante 20 min a Tª ambiente. En otros tubos de 50 ml se añadieron primero 15 ml de Ficoll y luego cuidadosamente los 30 ml de sangre evitando su mezcla con el Ficoll. Se centrifugaron todos los tubos a 1.500 rpm durante 20 min sin freno. Se recogieron las células de la interfase y se lavaron 3 veces a 1.500 rpm durante 5 minutos con PBS +2% FBS+ 1 mM EDTA. Por último, se contaron las células y se prepararon para expandir o criopreservar.

Para la diferenciación de los macrófagos, los monocitos se cultivaron durante 1 semana a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI+10% FBS añadiendo 10ng/ml de factor de proliferación de colonias de macrófagos (M-CSF Life Technologies).

Tras una semana de expansión los monocitos se han diferenciado a macrófagos para su uso en los diferentes ensayos.

### 12. Obtención y expansión de las células NK de sangre de cordón umbilical (CB-NK)

Las células NK se obtuvieron de sangre de cordón umbilical de donantes obtenidos del BST con previo consentimiento de su uso para la investigación. Las CB-NK se aislaron mediante la separación por gradiente de densidad, Ficoll, de las células mononucleadas y después se deplecionó la población de células NK por separación magnética, usando las esferas magnéticas “NK Cell Isolation kit” (Miltenyi Biotec). Tras el Ficoll y la selección magnética o bien se empezó la expansión de CB-NK o se criopreservaron de 5 a  $10 \times 10^6$  de células NK por crio-tubo hasta su uso en medio de congelación.

La expansión de las CB-NK se realizó con dos métodos distintos, en el primero se usaron células artificiales presentadoras de antígeno derivada de la línea K562 (Clon 9, C9) cedido amablemente por el Dr. Dean A Lee y Laurence JN Cooper (MDACC,

Houston, TX, USA). Específicamente el C9 expresa IL-21 unida a la membrana, el ligando 41BB, CD64 (FcγRI) y CD86.

Cada vial de CB-NK fue expandido en co-cultivo con C9 (previamente irradiado a 100Gy) a una ratio 2:1 (C9: CB-NK) durante 7 días en medio CLICKS añadiendo 400 UI/mL de IL-2 cada dos días. Tras 7 días, las CB-NK se volvieron a re-estimular con nuevo C9 y se siguió con la expansión hasta el día 14. Las CB-NK se usaron para hacer experimentos del día 12 al 15, tiempo al que las CB-NK están activadas y no queda C9 presente en el cultivo.

El segundo método de expansión no requiere del C9 y se utilizó para la producción de células CAR-NK, ya que el C9 disminuía la eficiencia de las infecciones. Las CB-NK se expandieron con el medio NK MACS (Milteny Biotec) con 1% de NK MACS Supplement (Milteny Biotec) y un 5% de SH. Brevemente, se resuspendieron las células a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL y se añadieron a una placa de 24 pocillos con 700  $\mu$ L/pocillo incubando a 37 °C durante 5 días. Al quinto día se procedió a la infección de las CB-NK ( $5 \times 10^5$  células/ml) a una MOI=5 con vectofusina a 10  $\mu$ g/mL, plaqueando 500  $\mu$ l por pocillo y centrifugando 1 h a 2.000 rpm a 32 °C. Tras 24 h se lavaron las células y se añadió medio NK MACS/ C9+CLICKs fresco para seguir con la expansión hasta el día 12-15 cuando las CB-NK están listas para realizar los ensayos pertinentes.

En resultados en el apartado 5 esta explicado ampliamente las modificaciones realizadas de estos dos métodos de expansión y todas las condiciones estudiadas para obtener un alto porcentaje de infección en CB-NK.

### 13. Ensayos de proliferación

Si las células estaban criopreservadas se descongelaron el día de antes de realizar el ensayo.

Una vez que las células están en cultivo, se cuenta, se lavan dejándolas en PBS a una concentración de  $1-20 \times 10^6$  de células/mL. Se marcan las células con CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) a 1  $\mu$ M y se incuban a 4°C durante 10 min. Después se lavan dos veces con 10 mL de RPMI+ 10% FBS y se siembran solas o en el cocultivo pertinente en placa. A las 96 h se recogen las células y se analiza por citometría de flujo, el marcaje de CFSE que emite a 488nm.

### 14. Ensayos de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se hicieron a varios ratios de células efectoras frente a células diana. En el caso de los ensayos con CB-NK frente a las células tumorales fueron de 5:1 a 0,25:1 y en el caso de los ensayos de linfocitos T frente a las células

tumorales de 1:1 a 0,125:1. Los ensayos se recogieron y se analizaron a 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h. Las células dianas fueron previamente modificadas para que expresasen el reportero GFP para poder analizar el número de células vivas por citometría sin necesidad de marcaje adicional. El análisis del porcentaje de células diana vivas tras el co-cultivo con las efectoras siguió las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ células diana vivas} = \% \text{ células GFP}^+ \text{ del co-cultivo a tiempo X} / \% \text{ células GFP}^+ \text{ del co-cultivo a día 0}$$
$$\% \text{ células diana vivas} = \% \text{ células GFP}^+ \text{ del co-cultivo a tiempo X} / \% \text{ células GFP solas a tiempo X}$$

El primer análisis se usó cuando los ensayos de citotoxicidad fueron recogidos con el citómetro Facs Canto II (BD Biosciences) recogiendo durante el mismo tiempo los eventos en todos los tubos. El segundo análisis se usó cuando los ensayos de citotoxicidad fueron recogidos con el citómetro Attune (Thermo Fisher) que permite recoger un volumen concreto.

### 15. Ensayo de citotoxicidad consecutivos

Los linfocitos T se pusieron en co-cultivo con células ARP1 a una ratio relativamente alta (1:1) para que eliminasen las células tumorales en pocos días (3-4 días). Cuando todas las células tumorales eran eliminadas, no presencia de GFP+ por microscopía fluorescencia, se recogía parte del pocillo para analizar por citometría de flujo la población de linfocitos T y se añadían otra vez células ARP1 para mantener la ratio 1:1 según el número total de Linfocitos T.

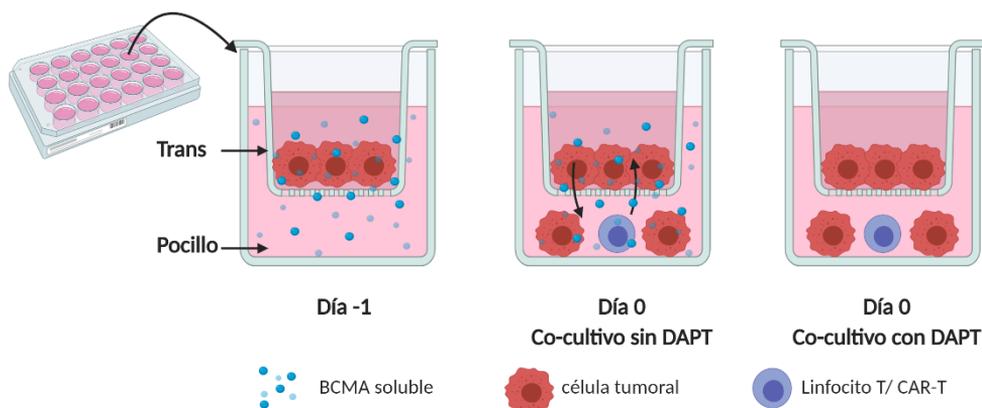
### 16. Cuantificación de proteínas solubles

La detección de proteínas solubles en suero de paciente, ratón o medio celular se hizo mediante el ELISA correspondiente y siguiendo el protocolo de la casa comercial. Para cuantificar las proteínas IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IFN- $\gamma$  se usaron los ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe Set Protocol (Biolegend). Para la cuantificación de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  las muestras se diluyeron 1/5, y para el IFN- $\gamma$  se diluyeron 1/30. Para cuantificar el BCMA soluble se usó el DuoSet ELISA Human BCMA (R&D systems). Las placas de ELISA se leyeron en el espectrofotómetro de placas Synergy (BioTek).

### 17. Ensayo de citotoxicidad con fuente continua de BCMA soluble

Se analizó el impacto de un inhibidor de la gamma secretasa, DAPT (Tocris), en la liberación de BCMA soluble por las células de MM y su efecto en la actividad de células CART. Para ello, se utilizaron placas denominadas Transwell que contienen un subpocillo superior al que denominamos Trans con un poro de 3  $\mu\text{m}$  que permite que

el medio del pocillo superior y el inferior sea compartido, mientras que las células no pueden pasar del pocillo al Trans ni a la inversa. En el día -1 se siembran en paralelo células ARP1 o medio solo en el Trans. En el día 0 se hicieron los cocultivos a ratio célula efectora: célula diana 0,5: 1, colocando en el pocillo inferior las células T (Linf. T o CAR-T) con la línea ARP1 con y sin el fármaco DAPT (1  $\mu$ M). Se recogieron y analizaron las muestras a 0 h, 24 h y 48 h mediante citometría de flujo igual que en los ensayos de citotoxicidad anteriormente explicado.



**Figura 10:** Dibujo explicativo del ensayo de citotoxicidad mediante un Transwell.

## 18. Microscopia confocal

Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany). El protocolo que se siguió para la realización de las distintas imágenes fue resumidamente el siguiente:

Tras contar las células, se tiñen con el marcador de célula viva CMAC (7-amino-4-chloromethylcoumarin, Thermo Fisher) que emite a 405 nm. Este marcaje permite diferenciar dos poblaciones celulares distintas en el caso de querer hacer un co-cultivo, o bien tiñiendo cada población celular con un marcador distinto o dejando una población sin marcar. Tras la incubación de media hora a 37 °C se realizan dos lavados con PBS y se comienza el co-cultivo el tiempo necesario de 30 min a 4 h según el estudio que se quiera realizar. Se transfieren 300  $\mu$ l del co-cultivo a un porta recubierto con poly-lisina y se centrifuga en una citocentrífuga 6 min a 1.600 rpm para facilitar la adhesión de las células al porta. Tras la centrifuga, se realiza un lavado con PBS durante 5 min, se fija (3% de PFA) durante 1 h a T<sup>a</sup> ambiente, se realizan dos lavados con PBS de 5 min, se permeabiliza (0,3% de tritón) durante 10 min a T<sup>a</sup> ambiente, se realizan dos lavados más de PBS, y se bloquea (0,3% BSA) durante 10 min a T<sup>a</sup> ambiente. Tras el bloqueo, se incuba el anticuerpo primario con la solución

bloqueante durante toda la noche en oscuridad a 4 °C. Al día siguiente tras dos lavados con PBS, se añade el anticuerpo secundario durante 1 h en oscuridad a 37 °C. Tras dos lavados se aspira todo el medio de los pocillos y se monta la lámina con el cubre con medio de montaje fluorescente DAKO (Dako, North America Inc).

### 19. Imágenes en lapsos de tiempo por microscopia confocal de fluorescencia

Para poder realizar una película, se realizaron imágenes de cultivos celulares a distintos tiempos *in vivo* con el microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) que posteriormente fueron montadas para obtener la película. El día anterior a la película se cubrió un porta con distintos pocillos con 200 µl de Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich) y se dejó durante la noche en el incubador. El día de la película se lavó la placa 3 veces con agua destilada y se dejó secando en flujo laminar durante 2 h. En el momento de la película se transfirieron las células diana (RPMI8226) para que se adhiriesen a la placa y pasados unos 30 min se transfirieron las células efectoras CART.

La línea celular RPMI8826 se modificó para sobre-expresar la proteína BCMA-GFP y las células efectoras fueron teñidas con el marcaje celular CMAC. Se tomaron imágenes de varios puntos del mismo pocillo cada 20 segundos durante 8 horas.

### 20. Ensayos *in vivo*

Todos los estudios *in vivo* en ratones fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Barcelona.

La colonia de ratones NSG fue producida y mantenida con la ayuda del Dr. Guillermo Suñé. En todos los experimentos *in vivo* se usaron ratones inmunodeprimidos de la cepa NSG, NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ, (The Jackson laboratory). La serie de mutaciones que presentan les producen una severa inmunodeficiencia combinada (deficiencia en el receptor de la IL-2 inhabilitando la vía de señalización de citoquinas y una falta de linfocitos T y B maduros y NK funcionales) que permite usar esta cepa para estudiar el sistema inmune humano, enfermedades infecciosas u oncológicas entre otras.

Cría de ratones: Las hembras se pusieron en cruce en las cajas de los machos (2 hembras por 1 macho) durante 1 semana. Tras la semana se devolvieron las hembras a sus cajas evitando un manejo excesivo durante las 6 semanas que dura la gestación (3 semanas) y lactancia (3 semanas). Después en el destete se separaron las crías hembras y machos en distintas cajas (5 animales por cajas). Los ratones para experimentos se usaron entre la 8-14 semana de edad.

Los ratones fueron irradiados a 2 Gy el día -1 e inoculados por la vena lateral de la cola con las células tumorales el día 0. En los experimentos de MM se usó la línea tumoral ARP1 y se inocularon 1 o  $1,5 \times 10^6$  células/ ratón dependiendo de si eran hembras o machos respectivamente, debido al tamaño inferior de las hembras. En los experimentos de LNH se usó la línea tumoral Ramos y se inocularon intravenosamente  $0,1-0,5 \times 10^6$  células/ ratón dependiendo del curso de la enfermedad más o menos agresiva que se quisiese estudiar. Las células inmunes (linfocitos, las células CAR-T, CAR-NK o CB-NK) se inocularon a día 7 o 14 dependiendo del modelo de enfermedad temprana o tardía que se quisiese estudiar. Cuando la enfermedad en el ratón era de una severidad moderada se eutanasiaron mediante dislocación cervical y se procesaron los tejidos del bazo y de la médula ósea

Todas las células tumorales usadas *in vivo* fueron previamente transducidas para expresar el reportero GFP-FFLuc y poder seguir el crecimiento de la enfermedad por bioluminiscencia semanalmente con el equipo Aequoria Luxiflux y la cámara ORCA-ER (Hamamatsu). El análisis y cuantificación de la bioluminiscencia se realizó con el software de ImageJ o el software de IVIS.

### 21. Procesamiento y marcaje de poblaciones celulares de tejidos

Los tejidos que se procesaron fueron médula ósea, bazo y en algunos casos tejido tumoral. El bazo se disgregó por fricción mecánica y posterior filtración de las células en un filtro de  $40 \mu\text{m}$ . La médula se obtuvo de los fémures mediante la adición de PBS con una jeringa a través del conducto medular.

Tras tener los tejidos disgregados se realizó un primer lavado con tampón FACS 5 min a 1.500 rpm. Después se realizó un bloqueo del FcR murino para evitar marcajes inespecíficos con el anticuerpo Anti-mouse CD16/CD32 (Fc shield) de (Tonbo Biosciences) a Tª ambiente durante 10 min. Tras un lavado con tampón FACS se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios o proteína recombinante para el marcaje del CAR en hielo durante 30 min. Tras dos lavados con PBS se incubaron las muestras con los anticuerpos secundarios en oscuridad durante 20 min. Tras dos lavados más se fijaron las células con 1% PFA y se analizaron por citometría de flujo.

### 22. Procesamiento y marcaje de células en sangre

La extracción de sangre de los ratones se hizo mediante la punción de la vena facial con una lanceta. Se extrajeron hasta  $200 \mu\text{l}$  de sangre por ratón en tubos con EDTA. Se centrifugaron a 2.500 rpm durante 10 min obteniendo una capa amarillenta superior correspondiente al plasma de los ratones que se guardó a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Luego se lisaron las células añadiendo  $900 \mu\text{l}$  tampón de lisis de eritrocitos (Roche) durante 7 min en hielo. Tras una centrifuga de 5 min a 1.500 rpm se retiró el sobrenadante y se

resuspendieron las células en 100  $\mu$ l tampón FACS. Posteriormente para el marcaje por citometría de flujo se siguió el mismo protocolo explicado en el anterior apartado 21.

### **23. Análisis estadístico**

El análisis de dos grupos de datos independientes se hizo mediante una T-Student verificando si cumplía la normalidad con el test de Levene. Para el análisis de varios grupos se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. Las curvas de supervivencia se realizaron con el método de Kaplan-Meier con Log-Rank. Se usaron el software Graphpad Prism v.5-v.8.1 o SPSSv.23.



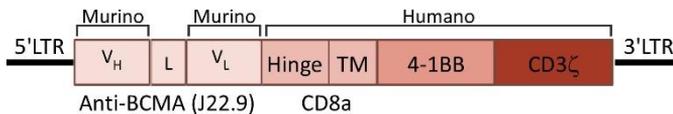
# Resultados

1r estudio



## 1. Diseño de un CART-antiBCMA murino (ARI2m) para el tratamiento del MM en una institución pública.

Para diseñar el CAR anti-BCMA murino se partió de la región intracelular del CAR anti-CD19 (ARI0001) diseñado previamente por investigadores del servicio de Inmunología del Hospital Clínic. Esta región incluye los dominios *hinge* y transmembrana del CD8a, el dominio co-estimulador 4-1BB y el dominio de activación CD3 $\zeta$ . La región extracelular que codifica para el scFv fue diseñada por nuestro colaborador Amer Najjar (M.D. Anderson Cancer Center, Houtson, Texas). Todos los dominios del CAR son secuencias humanas menos la región que codifica para el scFv que proviene del anticuerpo murino J22.9, un anticuerpo con actividad citotóxica probada contra el antígeno BCMA<sup>180</sup> (Fig.11).



Secuencia parte extracelular:

**Péptido señal (Ig $\kappa$ )- cadena pesada J22.9-linker (GGGS<sup>3</sup>)-cadena ligera J22.9**

MEAPAQLLEFLLLLWLDPDTTGQVQLQQSGGGLVQPPGSSLKLSCAASGIDFSRYWMSWVR  
 RAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKFII SRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYC  
 ASLYDYDGDAMDYWGQTSVTVSSGGGGSGGGGSDIVMTQSQRFMTT SVGDRV  
 SVTCKASQSVDNSVAWYQQKPRQSPKALIFASLRFSGVPARFTGSGSGTDFTLTISN  
 LQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGAGTKLELK

Secuencia parte intracelular:

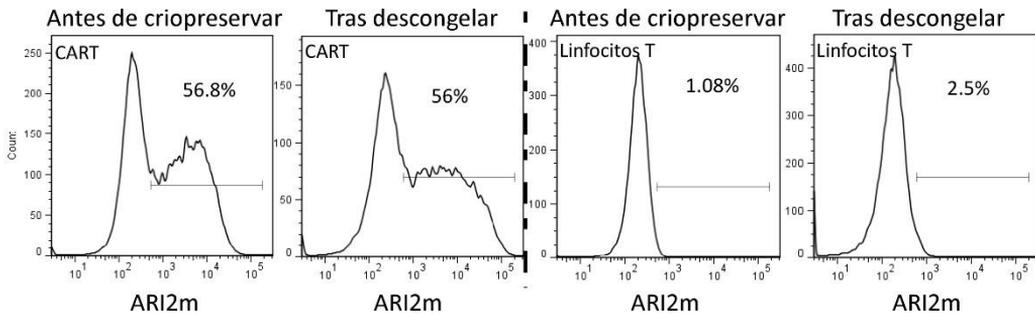
**CD8-41BB-CD3z**

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV  
 LLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS  
 RSADAPAYQQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPPQRKNPQEGLYNEL  
 QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

**Figura 11:** Diseño y secuencia peptídica del CAR ARI2m.

El plásmido elegido para el clonaje del CART fue el pccL-Ef1 $\alpha$ , cedido amablemente por el Dr. Luigi Naldini, para su uso tanto en el desarrollo preclínico como en el ensayo clínico de este producto. Su promotor es el *human elongation factor 1  $\alpha$*  (EF1 $\alpha$ ) que se expresa de forma estable en la mayoría de las células humanas incluso las células hematopoyéticas sin tendencia a silenciarse como otros promotores tipo CMV (citomegalovirus). Además, es un plásmido de 3ª generación aportando más seguridad en su manejo porque el plásmido necesario para el empaquetamiento del virus está dividido en 2 plásmidos (GAG-POL y REV) en vez de uno solo, por tanto, son necesarios 4 plásmidos para la formación del virus<sup>180</sup>.

Una vez obtenido el plásmido pccl-EF1a-BCMA-CD8a-41BB-CD3z y los vectores de empaquetamiento necesarios se desarrolló tanto la producción viral como la infección de linfocitos T de forma eficiente, obteniendo entre un 20-60 % Linf. ARI2m en los distintos ensayos *in vitro*. Además, también se comprobó que la expresión del CAR se mantiene tras descongelar los linfocitos criopreservados (Fig.12).

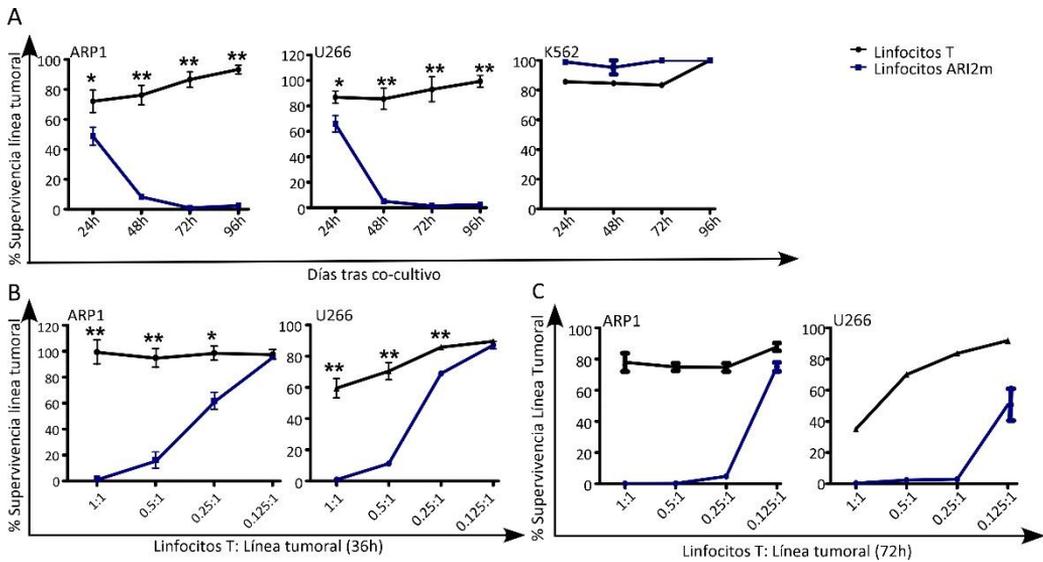


**Figura 12:** Porcentaje de infección con el CAR ARI2m en linfocitos infectados con el virus ARI2m (izquierda) y en linfocitos T sin infectar (derecha) antes y después de descongelar la muestra.

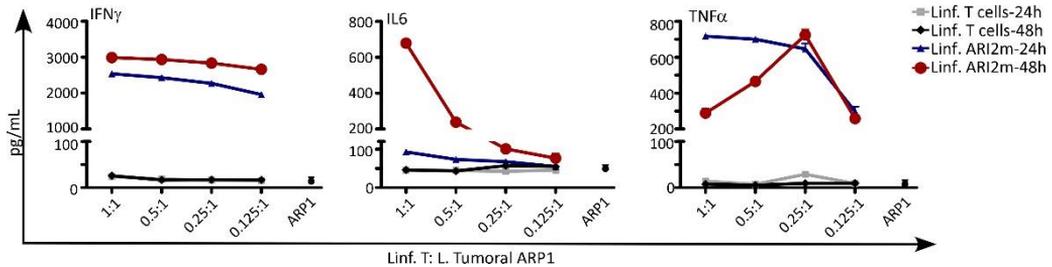
### 1.1. Las células ARI2m presentan una alta actividad anti-MM *in vitro*

Los ensayos de citotoxicidad demostraron que los linfocitos ARI2m (Linf. ARI2m) presentan actividad citotóxica frente a varias líneas de MM como las líneas ARP1 y U266 tanto a ratios altas (1:1) de células efectoras: diana, es decir, linfocitos T (Linf. T): células tumorales (L. Tumoral) (Fig.13A) a varios días (24-96h) como en ensayos de límite de dilución de dosis, es decir, ratios más bajas desde 1:1 hasta 1:8 de Linf. T respecto a las células tumorales a las 36-72h (Fig.13B-C). Además, cuando se enfrentaron los Linf. ARI2m a la línea tumoral de LMC K562, que no expresa el antígeno BCMA en su membrana, no se obtuvo ningún efecto citotóxico demostrando que su efecto lítico es específico frente al antígeno tumoral BCMA (Fig.13A).

Durante los ensayos de citotoxicidad de límite de dilución de dosis se recogió el sobrenadante para poder cuantificar las citoquinas liberadas de los co-cultivos a las 24 y 48h. Tras cuantificar mediante ELISA las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-6, se observó un claro aumento de las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  en los co-cultivos con los Linf. ARI2m frente a la línea tumoral de MM (ARP1) respecto a los mismos co-cultivos tan solo con los Linf. T, indicando la activación del CAR-T (Fig. 14). El IFN- $\gamma$  sigue aumentando a las 48h respecto las 24h mientras que el TNF- $\alpha$  es mayor a las 24h que las 48h demostrando que es una de las primeras citoquinas producidas al activarse el CAR. La IL-6 presenta niveles más bajos a 24h que incrementan a las 48h.



**Figura 13:** Actividad anti-mieloma *in vitro* de ARI2m. Ensayos de citotoxicidad de ARI2m contra las líneas tumorales ARP1 y U266 (MM) y K562 (LMC) a ratios 1:1 a 24-96h (A) y ensayo de límite de dosis de ARI2m contra las líneas de MM ARP1 y U266 a 36h (B) y 72h (C). \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.0001$



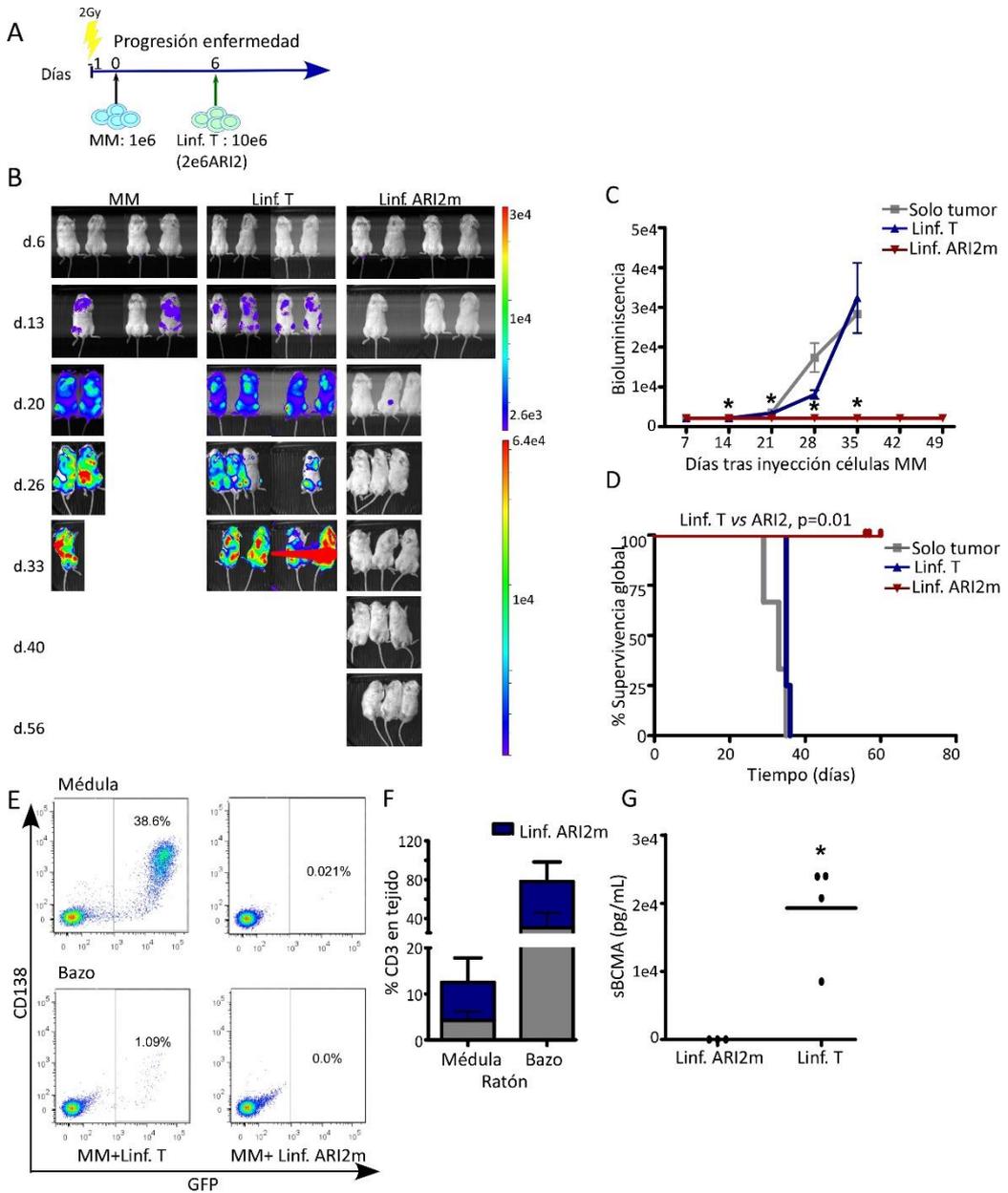
**Figura 14:** Cuantificación de la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 tras el co-cultivo de Linf.T/Linf. ARI2m con ARP1 a las 24 y 48h.

## 1.2. Los linfocitos ARI2m demuestran una alta actividad anti-MM *in vivo*

Tras mostrar la eficacia anti-MM de los linfocitos ARI2m en los ensayos *in vitro* decidimos probar el efecto citotóxico de los Linf. ARI2m en un modelo *in vivo*. El modelo animal escogido fueron ratones inmunodeprimidos de la cepa NSG, los ratones se irradiaron con una dosis de 2 Gy el día previo a la inyección de  $1 \times 10^6$  células tumorales ARP1. La enfermedad se desarrolló durante 6 días en los ratones y en el sexto día se infundieron  $10 \times 10^6$  linfocitos T no transducidos o  $10 \times 10^6$  linfocitos T que contenían un 20% de linfocitos ARI2m, por tanto, se infundieron un total de  $2 \times 10^6$  Linfocitos ARI2m (Fig.15A). El transcurso de la enfermedad se analizó semanalmente

por bioluminiscencia, observando que el grupo de ratones tratados con Linf. ARI2m no desarrollaban la enfermedad mientras que el grupo de ratones sin tratar o tratados solo con Linf. T sin transducir empezaban a tener señal a partir de la segunda semana (Fig.15B) teniendo que ser sacrificados antes que el grupo con Linf. ARI2m (Fig. 15C). La supervivencia global de los dos grupos de ratones sin tratar o tratados con Linf. T fue de 35 días mientras que la supervivencia del grupo tratado con Linf. ARI2m fue de 56 días (Fig.15D).

Además, cuando los animales fueron sacrificados se diseccionaron y se analizaron la médula ósea y bazo de todos los animales. Los ratones del grupo Linf. ARI2m no presentaban células tumorales en ninguno de los dos tejidos mientras que el grupo tratado solo con Linf. T presentaban un porcentaje importante de células tumorales en médula ósea (Fig.15E). El análisis de citometría de los tejidos también aportó que los linfocitos T se encuentran en su mayoría en el bazo mientras que los linfocitos ARI2m se encuentran mayoritariamente en la médula, lugar dónde empieza a desarrollarse la enfermedad (Fig.15F). Por último, se analizó el BCMA soluble por ELISA como posible marcador del desarrollo de la enfermedad en plasma, se detectó alrededor de  $2 \times 10^4$  pg/ml de BCMA soluble en el grupo tratado con Linf. T mientras que no se pudo detectar en el grupo tratado con Linf. ARI2m, confirmando la cuantificación de BCMA soluble como posible marcador de progresión de la enfermedad (Fig.15G).



**Figura 15:** Ensayo *in vivo*. Esquema del diseño experimental (A) e imágenes del seguimiento (B) y cuantificación de la progresión de la enfermedad de los distintos grupos por bioluminiscencia semanalmente (C). Supervivencia global de los grupos de ratones por días (D). Gráficos representativos de la citometría de flujo de la médula ósea y el bazo de los grupos tratados con Linf. T y con Linf. ARI2m al final del experimento (E). Porcentaje del total de linfocitos (CD3+) y linfocitos ARI2m en médula ósea y bazo del grupo tratado con ARI2m (F). Cuantificación del BCMA soluble del plasma de los ratones de los grupos Linf. T y Linf. ARI2m, \*p<0.05.

## 2. Humanización de ARI2m y comparativa de la actividad y eficacia del ARI2 murino y su versión humanizada.

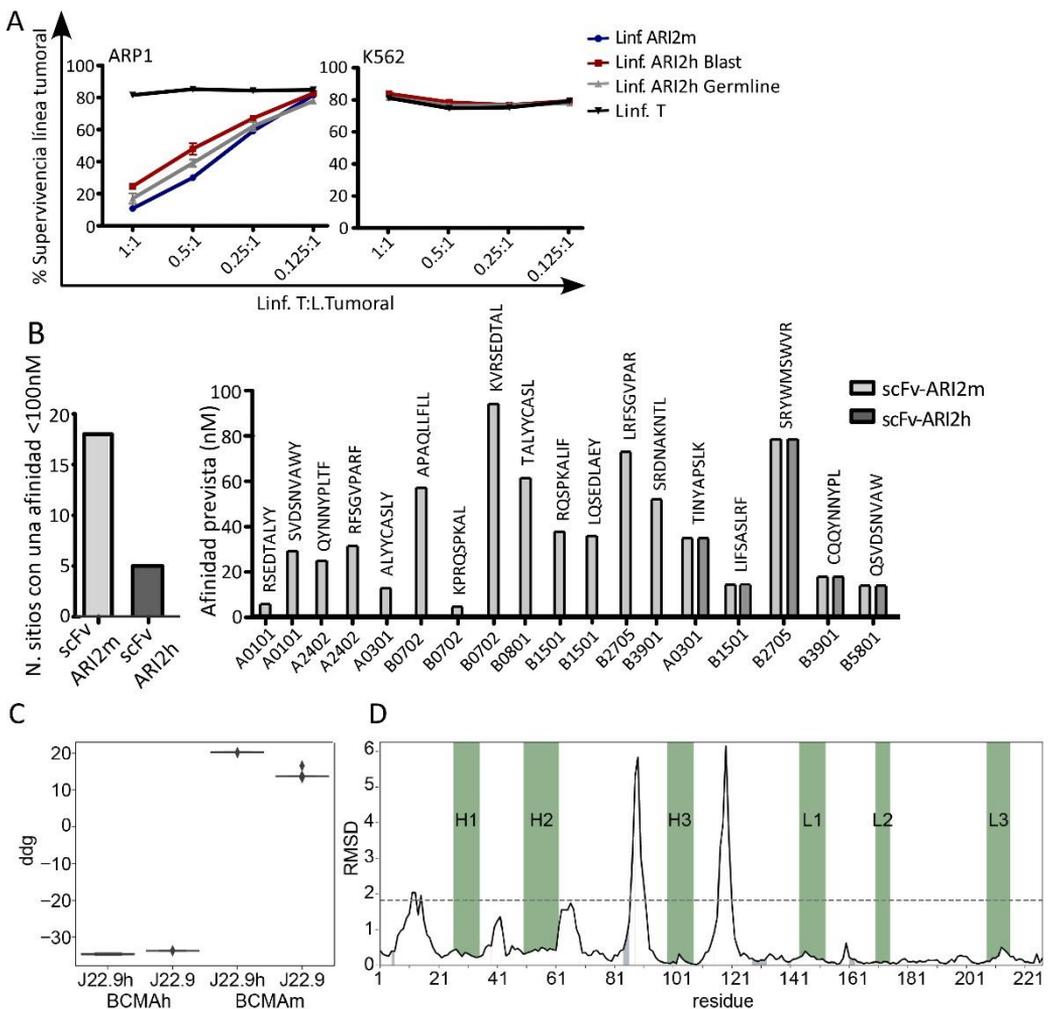
Una vez comprobado que los Linf. ARI2m presentaban una alta actividad anti-MM también en un modelo de ratón, decidimos humanizar la parte del scFv de ARI2m que aún era murino porque la desaparición temprana de un CAR en pacientes está relacionada, en parte, con el xenoreconocimiento del componente murino del CAR por parte del sistema inmune del paciente<sup>77</sup>. Para ello, contactamos con una empresa que diseñó dos secuencias humanizadas del scFv usando dos algoritmos predictivos distintos: BLAST y GERMLINE. Estos algoritmos predictivos intercambiaron algunos aminoácidos (aa) de la cadena pesada y ligera del anticuerpo J22.9 por sus homólogos humanos en una secuencia proteica de Ig humana (subrayados en amarillo en la Tabla. 10), con excepción de la zona de Vernier y los CDRs donde no se modificó ningún aa para que los puntos clave de afinidad del anticuerpo y la región que confiere estabilidad a la Ig siguieran intactos.

<b>Péptido señal (Igκ)- cadena pesada J22.9-linker (GGGS<sup>3</sup>)-cadena ligera J22.9</b>
Secuencia CAR murino:
<b>MEAPAQLLFLLLLLWLPD</b> <b>TTG</b> <b>QVQLQQSGGGLVQPGGSLKLS</b> CAASGIDFSRYWMSWVR <b>RAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKFI</b> SRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYC <b>ASLYYDYG</b> DAMDYWGQ <b>TSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS</b> DI <b>VM</b> TQ <b>SQ</b> RFMTT <b>SV</b> GDRV <b>SVTCKASQSVDSNVAWYQQKPRQSPKALIF</b> SASLRFSGV <b>PARFTG</b> SGSGTDF <b>TLTISN</b> <b>LQ</b> SEDLAEYFCQQYNNYPLTF <b>GAGTKLELK</b>
Secuencia CAR humanizado (variante Germline):
<b>MEAPAQLLFLLLLLWLPD</b> <b>TTG</b> <b>EVQLVE</b> SGGGLVQPGGSL <b>RL</b> SCAASGIDFSRYWMSWVR <b>Q</b> APGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLK <b>DRFTI</b> SRDNAK <b>NSLYLQ</b> MNSLRAEDTAVYYC <b>ASLYYDYG</b> DAMDYWGQ <b>TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS</b> DI <b>Q</b> MTQ <b>S</b> PSSLS <b>A</b> SVGDRV <b>TIT</b> CKASQSVDSNVAWYQQ <b>KPKAPKALIF</b> SASLRFSGV <b>PSRFS</b> SGSGTDF <b>TLTIS</b> <b>LQ</b> PE <b>DFATYYC</b> QQYNNYPLTF <b>GGG</b> TK <b>VEIK</b>

**Tabla 11:** Secuencia del CAR murina e humanizada versión Germline.

Primero, se realizaron una serie de ensayos preliminares *in vitro* con los dos constructos humanizados (BLAST y Germline) para seleccionar solo una de las dos variantes para los ensayos posteriores. Se decidió seguir adelante con la versión humanizada de Germline, que se denominó ARI2h, ya que presentaba una citotoxicidad mayor respecto a la variante BLAST frente a la línea tumoral ARP1 y seguía siendo específica contra el MM sin eliminar la línea control K562 (Fig. 16A). Para comprobar si la humanización del scFv disminuía la inmunogenicidad del scFv se hicieron unos modelos predictivos *in silico*, donde se demostró que el scFv de ARI2m era más inmunogénico que el ARI2h (Fig. 16B). Para ello se cuantificaron el número de

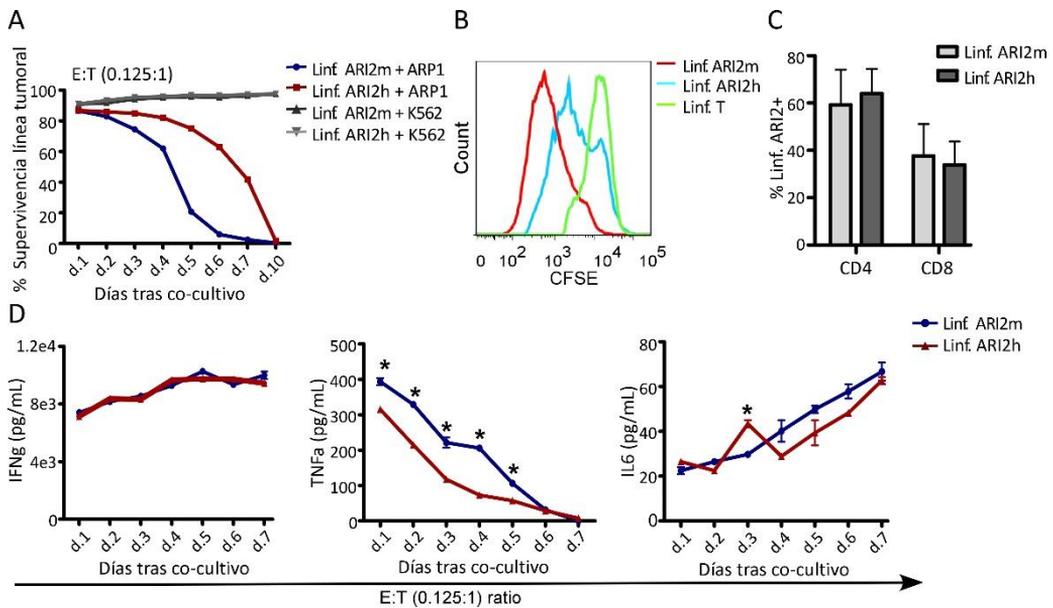
regiones de 9-aa que podían ser reconocidas por varios isotipos del CMH-I, obteniendo que mientras ARI2m tenía 18 sitios con una afinidad de unión menor a 100nM, ARI2h tan solo tenía 5 sitios de unión. Además, se calculó la afinidad teórica de los dos scFv, murino y humanizado, frente al anticuerpo BCMA murino y humano. Las predicciones de afinidad demostraron que tanto el scFv de ARI2m (J22.9) como de ARI2h (J22.9h) se unen con una afinidad similar al antígeno BCMA humano (BCMAh) y que ninguno de los dos CARs presenta afinidad al antígeno murino (BCMAm) (Fig. 16C-D). Además, el estudio en los cambios estructurales demostró una vez más, que los cambios de aa habían sido sobre todo en la cadena pesada del scFv y no en las regiones claves de reconocimiento antigénico como los CDRs (regiones en verde de la Fig. 16D).



**Figura 16:** Humanización de ARI2m. Ensayo de límite de dosis comparando las dos versiones de ARI2m humanizado Blast y Germline (A). Afinidad prevista de enfrentar 9-aa derivados del

scFv tanto de ARI2m como ARI2h contra distintos isotipos del CMH-I (B). Número total de sitios con una afinidad  $<100\text{nM}$  (izquierda) e interacciones específicas de distintos alelos de CMH-I con regiones de 9-aa del scFv de ARI2m o ARI2h (derecha). Energía libre de Gibbs (ddg) para estimar la afinidad de unión de los dos scFv contra el antígeno BCMA humano y murino (C) Comparación estructural de los dos scFv por RMSD (*root-mean-square deviation*) (D) La posición de los CDR equivale a las líneas verdes, mientras que los cambios entre los dos anticuerpos son las líneas grises debajo de la curva.

Debido a que observamos una ligera mayor citotoxicidad en el grupo de Linf. ARI2m que en los dos Linf. ARI2h (Fig. 16A) decidimos hacer varios ensayos a largo plazo a una baja ratio (0,125:1) de células efectoras: diana. El ensayo de citotoxicidad a largo plazo (Fig. 17A) demuestra que los Linf. ARI2h tiene una cinética más lenta que los Linf. ARI2m, pero la misma actividad citotóxica a largo tiempo eliminando la línea tumoral a los 10 días. Esta cinética más lenta de Linf ARI2h fue confirmada en ensayos de proliferación mediante la técnica de CFSE, dónde también se observa que hay una mayor proliferación de Linf. ARI2m tras 4 días en co-cultivo con la línea tumoral (ARP1) que Linf. ARI2h (Fig. 17B). Posteriormente, quisimos analizar si la infección con ARI2m o ARI2h conllevaba un fenotipo distinto en los linfocitos ARI2. Tras el análisis por citometría de flujo de las poblaciones CD4 y CD8 observamos que la proporción era similar en ambos casos (Fig.17C). Por último, se recogieron los sobrenadantes del ensayo a largo plazo (Fig. 17A) para comparar también el perfil de citoquinas en ambos CARTs. Ambos CARs tanto los Linf. ARI2m como Linf. ARI2h produjeron los mismos niveles de IFN- $\gamma$  e IL-6, mientras que Linf. ARI2h produjo niveles más bajos de TNF- $\alpha$  que Linf. ARI2m, probablemente debido a su distinta cinética (Fig. 17 D).



**Figura 17:** Ensayo de citotoxicidad a largo plazo comparando ARI2m y ARI2h contra las líneas tumorales ARP1 (MM) y K562 (LMC) (A), su proliferación a lo largo de 4 días a ratio 0,5:1 de Linf. T: ARP1 (B), su fenotipo (C) y su perfil de citoquinas pro-inflamatorias (D). \* $p < 0.05$ .

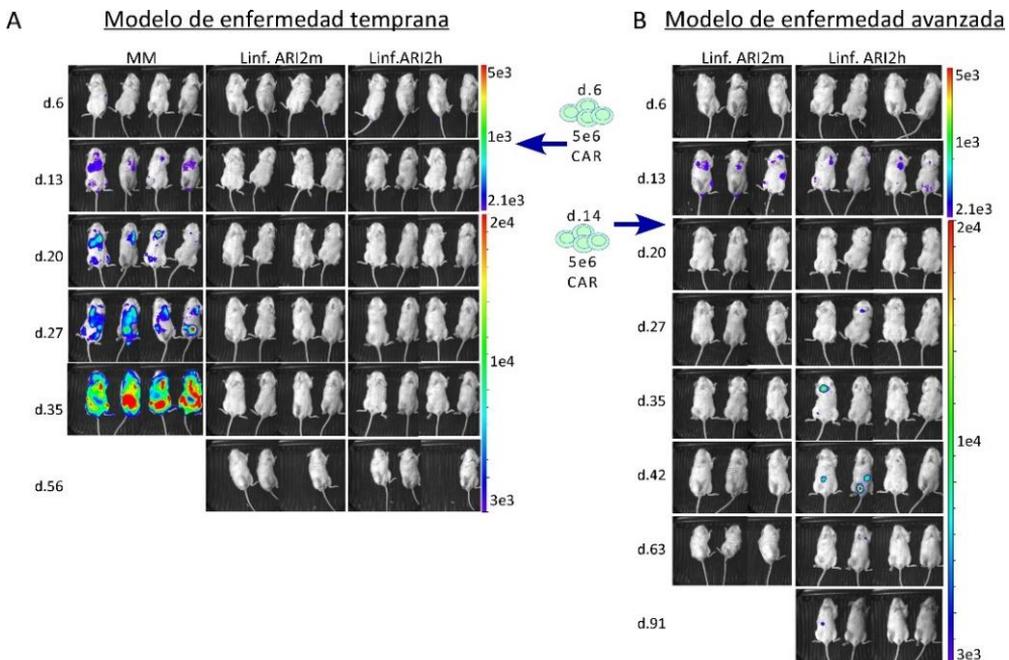
## 2.1. Eficacia anti-MM de ARI2m vs ARI2h *in vivo*

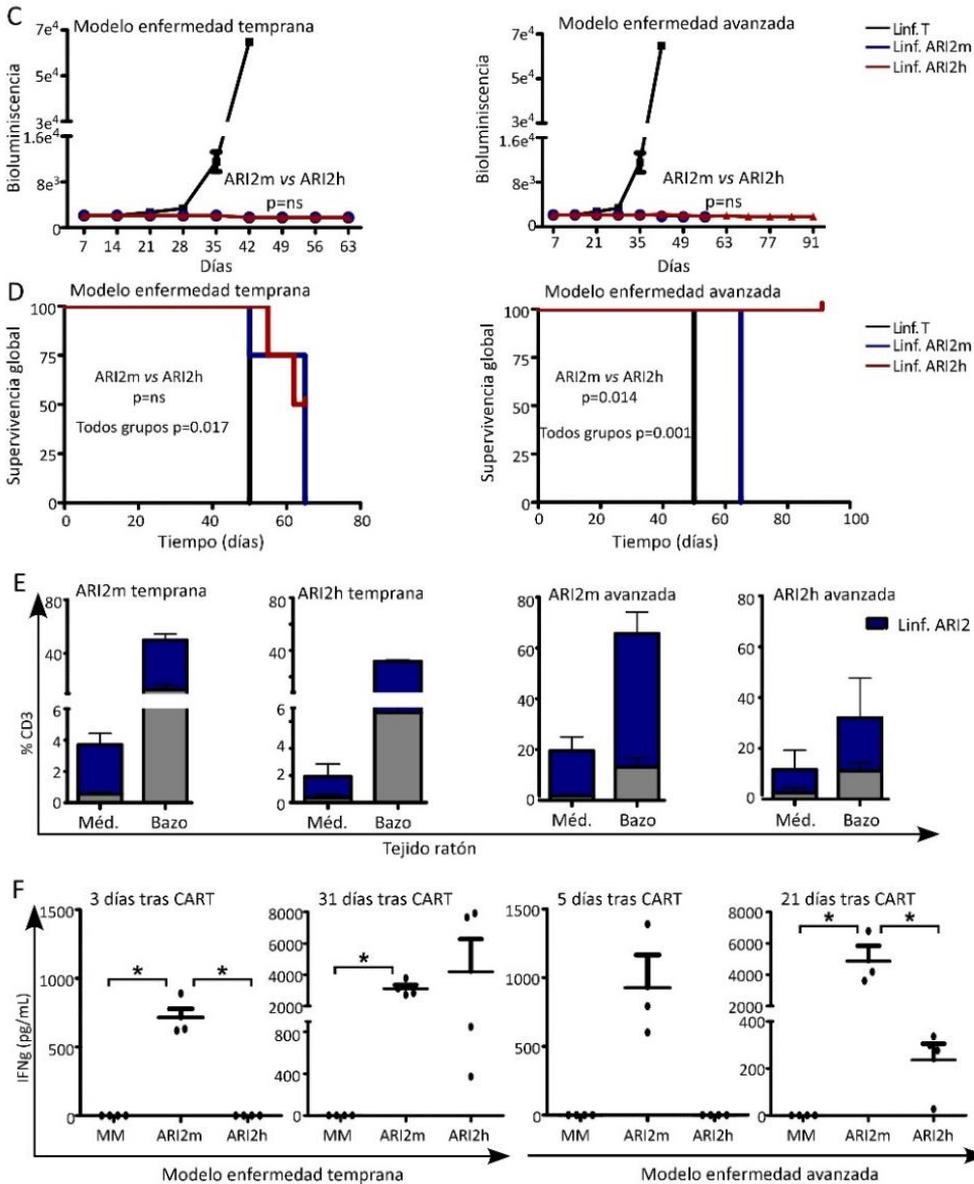
Para tener un mayor conocimiento de la actividad de ARI2h en comparación con ARI2m, los dos CARTs se pusieron a prueba en dos modelos de enfermedad *in vivo*. En los dos modelos los ratones fueron irradiados en el día -1 del experimento y pinchados con una dosis de  $1 \times 10^6$  de células ARP1 el día 0. La diferencia entre los modelos consistió en el día de tratamiento, en el modelo de enfermedad temprana se trataron los ratones con ambos grupos de CART el día 6 (Fig. 18A), mientras que en el modelo de edad avanzada se trataron los animales en el día 14, cuando los ratones ya presentaban carga tumoral en las imágenes (Fig. 18B). La dosis de CART fue la misma de  $5 \times 10^6$  de linfocitos T en todas las condiciones.

En el modelo de enfermedad temprana ambos CARTs evitaron la progresión de la enfermedad (Fig. 18C). Sin embargo, en el modelo de enfermedad avanzada mientras que el grupo de ratones tratados con ARI2m eliminaron la enfermedad por completo, el grupo tratado con ARI2h mostraba niveles muy bajos de enfermedad por bioluminiscencia en determinados puntos, aunque no significativos (Fig. 18C). El sacrificio de los animales control se realizó en el día 50 debido a un estadio avanzado de la enfermedad. En el modelo de enfermedad temprana los ratones empezaron a presentar síntomas de EICH, alrededor del día 50, por tanto, tuvieron que ser sacrificados, esta sintomatología fue más grave en el grupo de ratones tratados con

ARI2m traduciéndose en una menor supervivencia de este grupo debido a la EICH (Fig. 18D). En el modelo de enfermedad avanzada encontramos otra vez una mayor supervivencia del grupo de animales tratados con ARI2h por los mismos motivos (Fig. 18D). Además, en ambos modelos de enfermedad se encontraron un mayor número de linfocitos T totales en el grupo tratado con Linf. ARI2m que Linf. ARI2h (Fig. 18E). Este mayor número de linfocitos T podría ser la causa del mayor xeno-EICH observado en el grupo tratado con Linf. ARI2m y su menor supervivencia, resultados observados por otros grupos anteriormente<sup>77</sup>.

Por último, se analizó la secreción de IFN- $\gamma$  en ambos grupos a varios tiempos, ya que la liberación de IFN- $\gamma$  puede ser indicativo de la actividad del CART. Se detectó menos IFN- $\gamma$  en el grupo tratado con Linf. ARI2h en ambos modelos de enfermedad que en el grupo tratado con Linf. ARI2m, este hecho puede deberse a la cinética más lenta ya comentada en los ensayos *in vitro*. En el modelo de enfermedad temprana no se detecta IFN- $\gamma$  en el grupo Linf. ARI2h a los 3 días de la infusión de los CARTs pero si en el día 31 tras la infusión, de hecho en ese punto la media de secreción de IFN- $\gamma$  es mayor en el grupo de ARI2h (Fig. 18F). En el modelo de enfermedad avanzada se observó la misma tendencia, apenas se detectó IFN- $\gamma$  en el día 5 tras la infusión del CAR, pero los niveles aumentaron en el día 21 tras la administración de Linf. T (Fig. 18F).

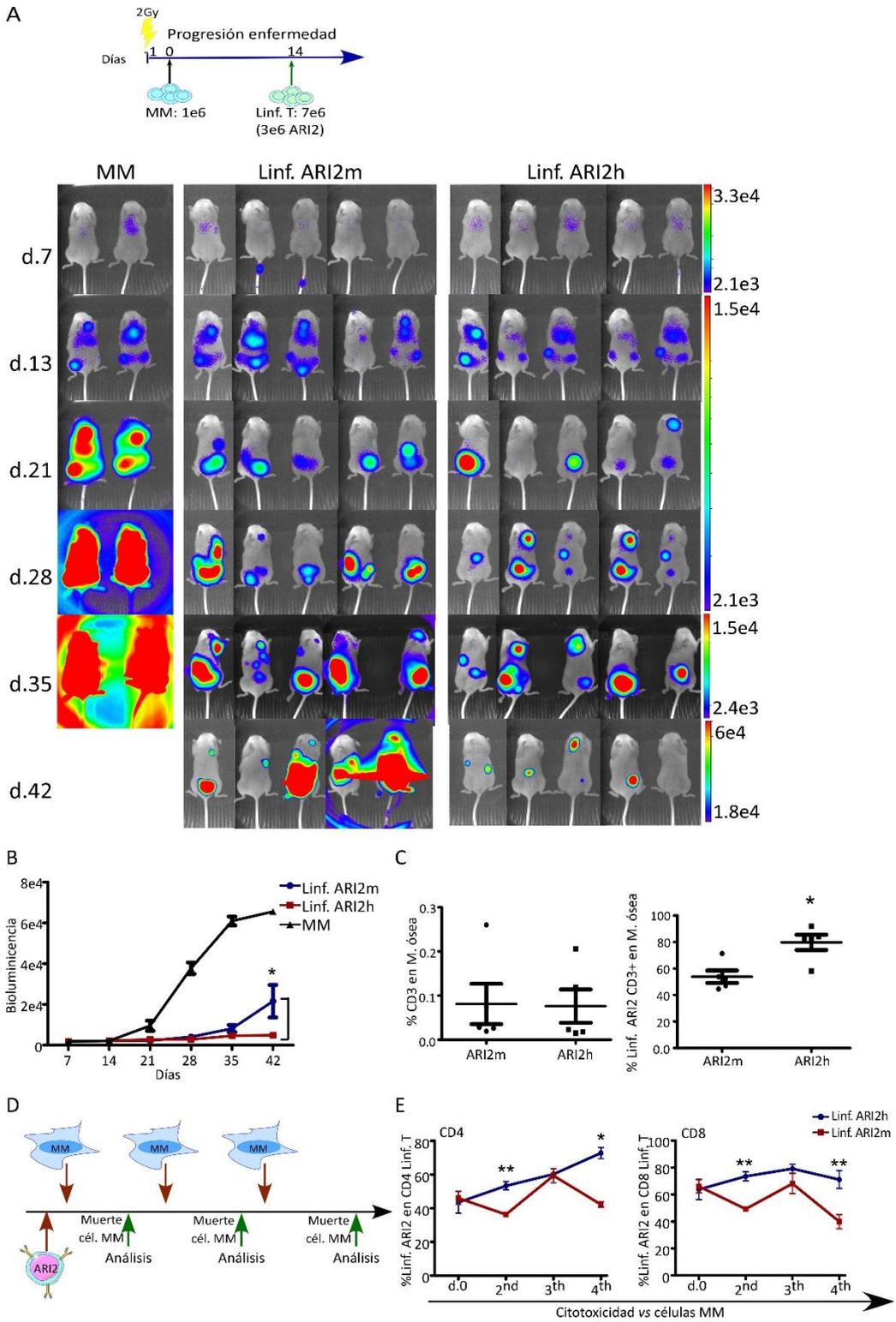




**Figura 18:** Comparativa in vivo de ARI2m vs ARI2h. Imágenes del desarrollo de la enfermedad en el modelo de enfermedad temprana (A) y avanzada (B) tratados con ambos CARTs y el grupo control solo con la enfermedad (MM) por bioluminiscencia semanalmente y su cuantificación (C). Curva de Kaplan-Meier representando la supervivencia global de los distintos grupos (D). Porcentaje total de linfocitos CD3<sup>+</sup> y la subpoblación de Linf. ARI2 encontrados en médula ósea y bazo de los dos modelos de enfermedad (E). Cuantificación del IFN- $\gamma$  obtenido del plasma de los ratones en los días 3 y 31 del modelo de enfermedad temprana y en los días 5 y 21 en el modelo de enfermedad avanzada. \*p<0.05

Estos resultados sugerían una actividad más rápida de los Linf. ARI2m que de los Linf. ARI2h, por tanto, nos preguntamos si en una situación de mayor carga tumoral podría conllevar un agotamiento y desaparición más temprana también del CAR. En base a estos resultados, decidimos hacer otro modelo de enfermedad más avanzada *in vivo*. Para ello irradiamos e infundimos  $1 \times 10^6$  células ARP1 al igual que en el experimento anterior, pero esta vez tratamos todos los ratones a día 14 con menos CAR,  $3 \times 10^6$  Linf. ARI2, en vez de  $5 \times 10^6$  Linf. ARI2. Ninguno de los dos CARTs (ARI2m y ARI2h) acabó con la enfermedad, pero en esta ocasión ARI2h contuvo mejor el desarrollo de la enfermedad en comparación con ARI2m (Fig. 19A-B). Los animales tuvieron que ser sacrificados debido al desarrollo de la enfermedad en el día 42 del experimento (Fig. 19B). En el análisis por citometría de flujo a punto final apenas se detectaron linfocitos T. Sin embargo, el grupo de ratones tratados con Linf. ARI2h presentó un mayor número de Linf. ARI2h en médula ósea (Fig. 19C).

Tras analizar los resultados de los tejidos de ratones, decidimos realizar otro ensayo *in vitro*, donde expusimos ambos CARTs frente a células de MM consecutivas veces (Fig. 19D). Este ensayo confirmó que los Linf. ARI2h tenían una mayor persistencia tanto en la población CD4+ como en CD8+ que los Linf. ARI2m (Fig. 19E).

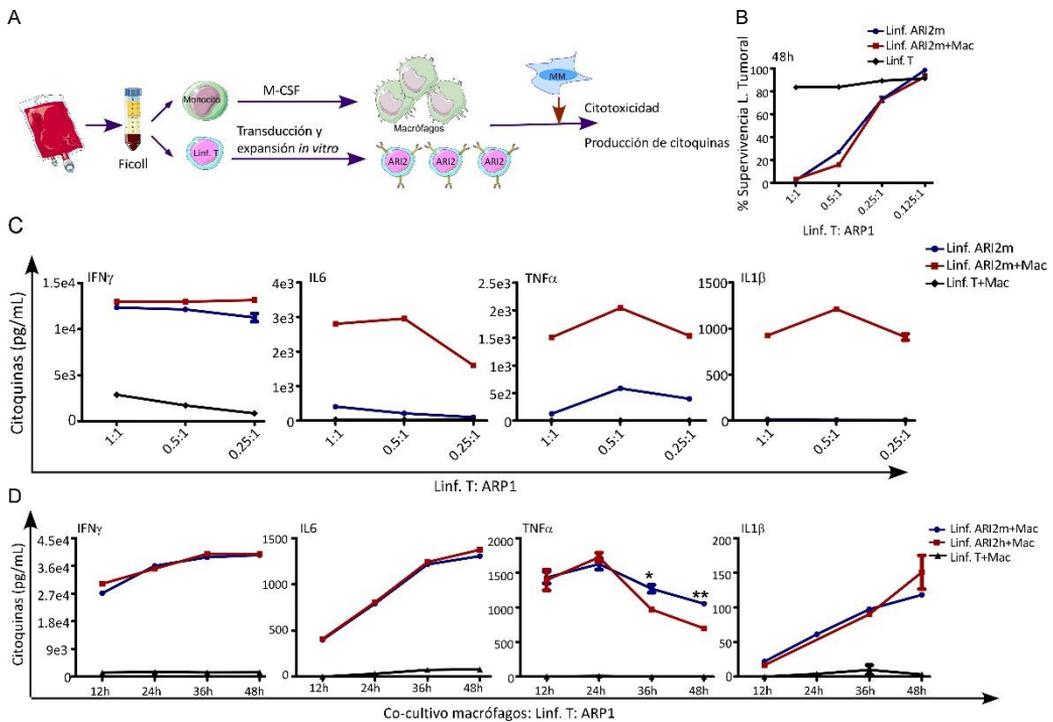


**Figura 19:** Comparativa de ARI2m vs ARI2h en un modelo de enfermedad muy avanzada. Diagrama del ensayo e imágenes semanales del desarrollo de la enfermedad en los distintos grupos de tratamiento semanalmente (A). Gráfica de la progresión de la enfermedad por bioluminiscencia semanalmente (B). Porcentaje de Linf. T CD3 en médula ósea y porcentaje de Linf. ARI2 procedentes de los Linf. T encontrados en médula ósea (C). Esquema del ensayo citotoxicidades consecutivas (D) y gráficas del porcentaje de Linf. ARI2 (ARI2m y ARI2h) en las poblaciones CD4 y CD8 (E). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0001$ .

## 2.2. Adición de macrófagos en nuestro modelo *in vitro*

En los ensayos *in vitro* realizados anteriormente no pudimos detectar citoquinas pro-inflamatorias claves en la CRS tal y como la IL-1 $\beta$ , y observamos unos niveles bajos de IL-6, por tanto, basándonos en estudios previos<sup>181,182</sup> donde se confirmaba que los macrófagos son los principales productores de IL-6, IL-1 $\beta$ , y TNF- $\alpha$ , quisimos añadir esta población inmune en los ensayos de citotoxicidad para tener un modelo *in vitro* más similar al real que nos permitiera analizar el perfil pro-inflamatorio de ambos CARs. Los macrófagos se añadieron en los co-cultivos en la misma proporción que se encuentran presentes en la sangre periférica los monocitos respecto la población linfocitaria, 1:3 respectivamente. Además, para evitar posibles efectos de rechazo, las dos poblaciones (Linf. T y monocitos) se obtuvieron del mismo donante (Fig. 20A).

Tras la diferenciación de monocito a macrófago, se realizaron los estudios *in vitro*. La adición de macrófagos no afectó a la actividad citotóxica de los CARTs (Fig. 20B) aunque sí incrementó la detección de varias citoquinas (Fig. 20C). Con la adición de macrófagos el IFN- $\gamma$  aumentó levemente, ya que su secreción depende directamente de la actividad de los linfocitos. Sin embargo, sí aumentó significativamente la detección de las demás citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$  y además, permitió la detección de la IL-1 $\beta$ . Una vez puesto a punto el modelo de co-cultivo con macrófagos decidimos comparar los dos CARTs, ARI2m y ARI2h añadiendo los macrófagos en el co-cultivo para tener un perfil pro-inflamatorio de ambos CARs. La liberación de citoquinas fue parecida en las dos poblaciones exceptuando el TNF- $\alpha$  que fue mayor en el grupo de Linf. ARI2m, resultados parecidos a los ya obtenidos en la primera comparativa a largo plazo *in vitro* de los dos CARTs (Fig.17D) confirmando, por tanto, que los Linf. ARI2h liberan menos TNF- $\alpha$  que los Linf. ARI2m, tal vez, debido a que los Linf. ARI2h presentan una cinética más lenta, que podría ser beneficiosa tal y como se comprobó en el segundo ensayo comparativo *in vivo* (Fig. 19B).



**Figura 20:** Esquema representativo de la obtención linfocitos T y macrófagos de un mismo donante (A). Citotoxicidad del co-cultivo de Linf. T+ ARP1 con/sin Macrófagos (Mac) (B) y cuantificación de las citoquinas IFN $\gamma$ , IL6, TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  liberadas durante los co-cultivos a las 48h (C). Cuantificación de las citoquinas liberadas durante el co-cultivo de Linf. ARI2m/ARI2h+ARP1 con/ sin Mac a distintos tiempos (12, 24, 36 y 48h) (D). \*p<0.05. \*\*p<0.0001.

### 3. Estudio del efecto del BCMA soluble y su inhibición en la terapia CART para MM.

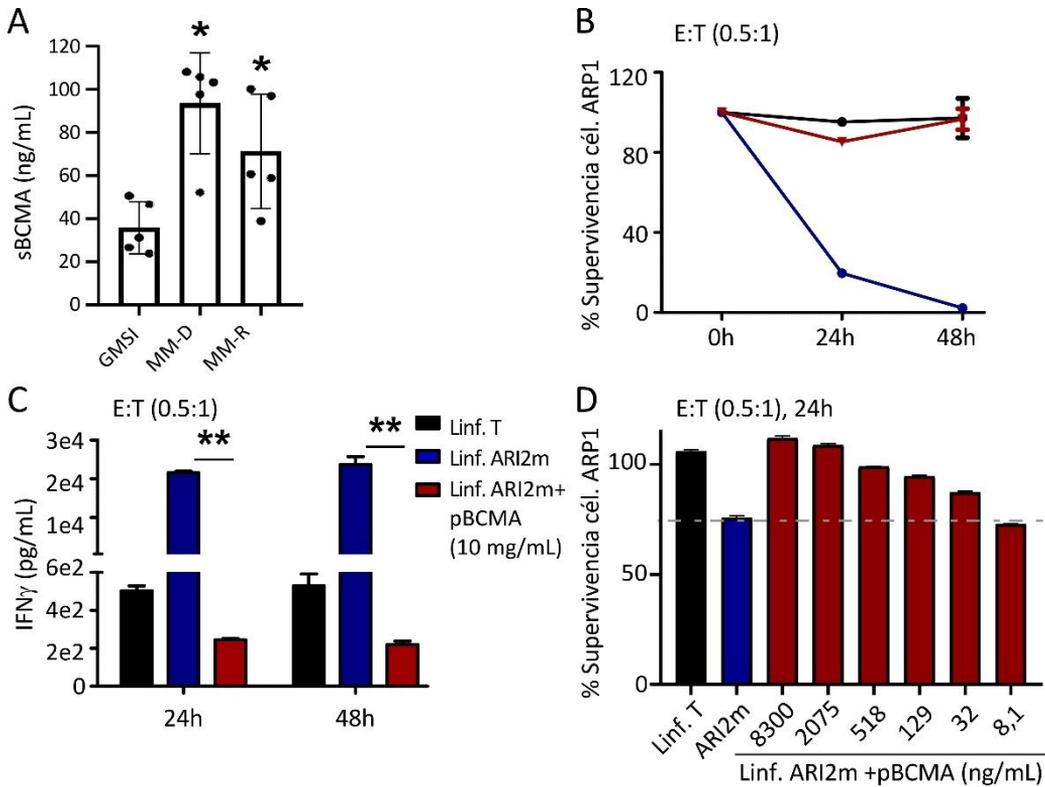
Durante el desarrollo de esta tesis numerosos artículos referentes a la terapia CART y en particular algún tipo de CART-BCMA han sido publicados<sup>122,123</sup>. Los resultados publicados demuestran que  $1 \times 10^6$  linfocitos CART/kg para la terapia CART-CD19 para LLA son suficientes para obtener respuestas objetivas, e incluso respuestas completas en pacientes<sup>183</sup>. Mientras que los resultados obtenidos en CART-BCMA demuestran la necesidad de una mayor dosis de CARTs, alrededor de  $150 \times 10^6$  linfocitos CART totales<sup>123</sup>, que equivaldría a unos  $3 \times 10^6$  linfocitos T/kg si suponemos un peso medio de 70 kg. Nosotros hipotetizamos que esta mayor dosis necesaria para el tratamiento de pacientes con MM podría ser debido a la capacidad de las células de MM de secretar el BCMA expresado en su membrana al medio (sBCMA). En 2015 Laurent, S.A. *et al*<sup>184</sup> demostraron que la proteína  $\gamma$ -secretasa es la encargada de realizar un corte intracelular de la proteína de membrana BCMA y liberarla al medio como sBCMA. Este sBCMA podría interactuar con los CARTs e inhibir en parte la actividad

del CART anti-BCMA contra las propias células tumorales, explicando porque es necesaria una mayor dosis de CART para obtener el mismo efecto que en otras enfermedades.

Por tanto, primero cuantificamos el sBCMA en muestras de plasma de pacientes con GMSI, MM al diagnóstico y MM en recaída teniendo como control negativo muestras de donantes sanos. Los resultados obtenidos fueron los esperados demostrando que los pacientes con MM tienen niveles más elevados de sBCMA (Fig. 21A). Además, este ensayo unido a la facilidad de obtención de plasma de pacientes y su análisis mediante la técnica de ELISA sugiere el uso del sBCMA como biomarcador adicional del seguimiento del MM tras la terapia CART<sup>114</sup>.

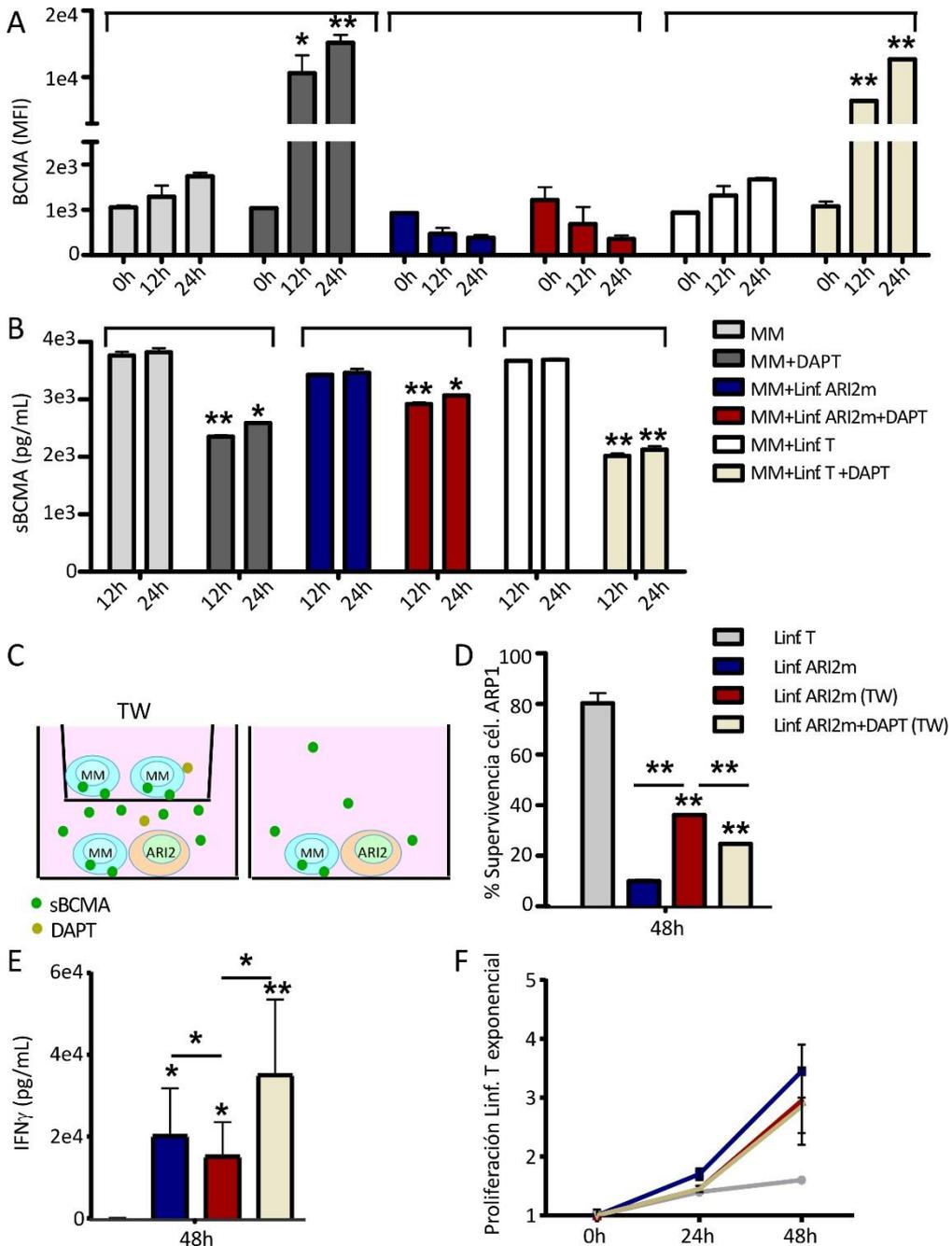
Para comprobar si el sBCMA inhibe la actividad del CAR, co-cultivamos los Linf. T/ Linf. ARI2m con la línea tumoral y con o sin presencia de proteína recombinante BCMA. En estos ensayos comprobamos que la adición de proteína recombinante a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  inhibía por completo la actividad del CART (Fig. 21B). Este efecto también se comprobó cuantificando el IFN- $\gamma$  secretado del sobrenadante de los co-cultivos, dónde observamos que el grupo con proteína recombinante BCMA presentó una disminución significativa de producción de la citoquina (Fig. 21C). Por último, quisimos comprobar si la cantidad de sBCMA presente en los pacientes, alrededor de 100  $\text{ng}/\text{mL}$ , era suficiente para inhibir parte de la actividad del CART. Para ello, hicimos un ensayo de titulación con la proteína recombinante, para saber la cantidad mínima de proteína recombinante (equivalente a sBCMA) necesaria para inhibir parte de la actividad del CART. Tras el ensayo demostramos que es necesario alrededor de 32 $\text{ng}/\text{mL}$  de proteína recombinante para inhibir la actividad del CART (Fig. 21D), cantidad inferior a los 100  $\text{ng}/\text{mL}$  presentes en los pacientes de MM y, por tanto, confirmando que el sBCMA presente en estos pacientes puede conllevar una inhibición del CART.

La liberación de BCMA al espacio extracelular es mediado por la proteína  $\gamma$ -secretasa, por tanto, la inhibición de  $\gamma$ -secretasa conlleva la disminución del sBCMA<sup>184</sup>. Nosotros quisimos comprobar si este efecto también tenía lugar durante la terapia CART. Para ello, utilizamos el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa DAPT<sup>184</sup>. Primero, confirmamos el efecto del inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa, DAPT, en las células de MM cuantificando el BCMA expresado en la membrana por citometría de flujo y el sBCMA por ELISAs. Los resultados demuestran que la adición de DAPT aumenta la expresión de BCMA en superficie tanto en las células de MM solas (MM ctrl) como en co-cultivo con Linf. T



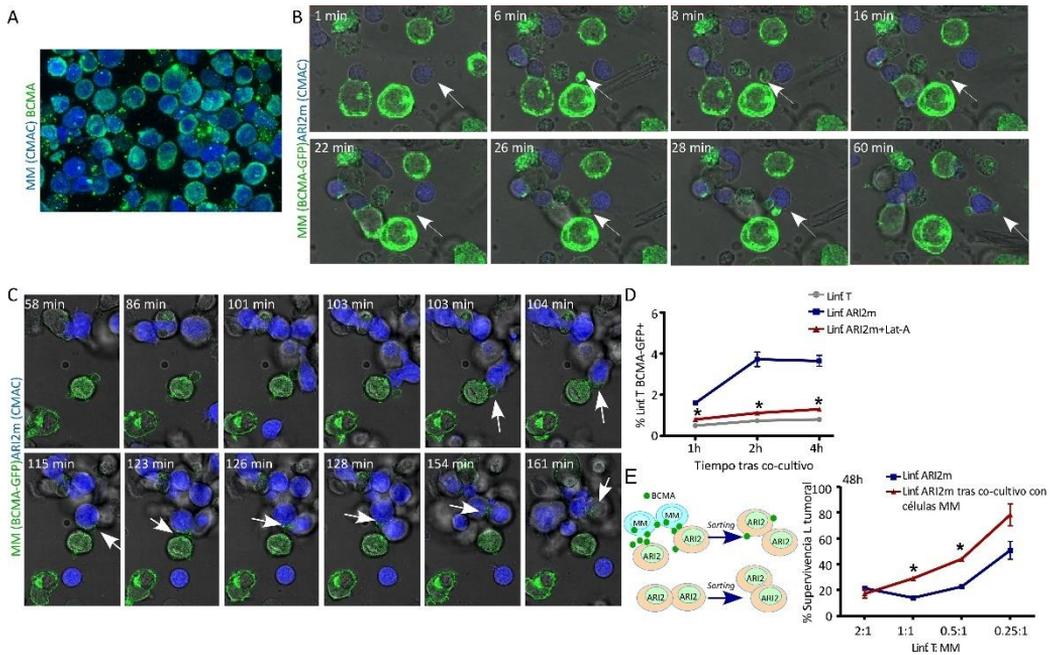
**Figura 21:** Cuantificación de BCMA soluble (sBCMA) presente en el plasma de pacientes con GMSI, MM al diagnóstico (MM-D) y MM recaídos (MM-R) (A). Citotoxicidad del co-cultivo de Linf. T+ ARP1 con y sin proteína BCMA recombinante (pBCMA) a 10  $\mu$ g/mL (10000 ng/mL) (B) y cuantificación del IFN- $\gamma$  del sobrenadante de los co-cultivos (C). Citotoxicidad de Linf. ARI2m+ ARP1 tras la adición de pBCMA en dilución seriada a las 24h (D). \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.0001$

(Fig. 22A). El aumento de BCMA en superficie no es significativo en el grupo de Linf. ARI2m creemos que debido a la rápida actividad citotóxica de los Linf. ARI2m *in vitro* frente a las células de MM que no permite cuantificar células de MM vivas (Fig. 22-A). En cambio, el sBCMA disminuyó significativamente en todas las condiciones tras la adición de DAPT (Fig. 22B). Para comprobar si la adición de DAPT incorporaba alguna mejora en la actividad del CART, diseñamos un ensayo de citotoxicidad en placas *transwell*. En el pocillo superior se añadieron células tumorales a alta densidad para conseguir una liberación constante de sBCMA al medio del pocillo superior al inferior. En el pocillo inferior se añadió el co-cultivo de Linf. T/ARI2m y células tumorales con o sin la adición de DAPT (Fig. 22C). Estos ensayos demostraron que la liberación constante de sBCMA afecta a la actividad del CART, pero también que la adición de DAPT revierte el efecto del sBCMA (Fig. 22D) y aumenta la liberación de IFN- $\gamma$  (Fig. 22E) sin impactar en la proliferación de los linfocitos T (Fig. 2F).



**Figura 22:** MFI del BCMA en superficie (A) y sBCMA (B) en las células tumorales solas (MM ctrl) como en co-cultivo Linf. T/Linf. ARI2m con y sin DAPT. Dibujo representativo del experimento en placa de *transwell* con la adición de DAPT (C). Ensayo de citotoxicidad del transwell (D), liberación del IFN- $\gamma$  del ensayo (E) y proliferación de Linf. T (F). \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.0001$

Por otro lado, por microscopia confocal de fluorescencia observamos la liberación de BCMA por parte de las células tumorales en vesículas al medio (Fig. 23A). Para comprobar si estas vesículas inhibían la actividad del CART sobre-expresamos la proteína BCMA fusionada con GFP en varias líneas de MM y se co-cultivaron con Linf. T o Linf. ARI2m durante 3 horas, periodo en el cual se realizó una adquisición seriada de imágenes por microscopia confocal de fluorescencia para obtener distintas películas. En el análisis de las imágenes obtenidas de una de las películas, se observa como los Linf. ARI2m (en azul en las imágenes) interaccionan con las vesículas BCMA-GFP+, aparte de con las células tumorales (Fig. 23B). Además, en otra serie de imágenes también se puede observar cómo durante el transcurso de la película los Linf. ARI2m adquieren parte del BCMA expresado en la superficie de las células tumorales. Esta adquisición de BCMA por parte de los Linf. ARI2m produce fratricidio entre los linfocitos (Fig. 23C), este fenómeno que recibe el nombre de trogocitosis ha sido observado recientemente en otros estudios sobre CARTs<sup>184</sup>. Para confirmar este fenómeno de trogocitosis decidimos realizar un último experimento con un inhibidor de la trogocitosis Latrunculin-A (Lat-A). Para ello se co-cultivaron Linf. ARI2m y células tumorales en presencia o no de Lat-A observando que la adición de Lat-A disminuía el número de los Linf. ARI2m con BCMA-GFP en sus membranas (Fig. 23D). Tras este co-cultivo los Linf. ARI2m BCMA-GFP+ fueron separados por FACS *sorting* y añadidos a un segundo co-cultivo con células tumorales confirmando que los Linf. ARI2m BCMA-GFP+ presentaban una actividad citotóxica menor que los Linf. ARI2m sin previo contacto con células tumorales (Fig. 23E).



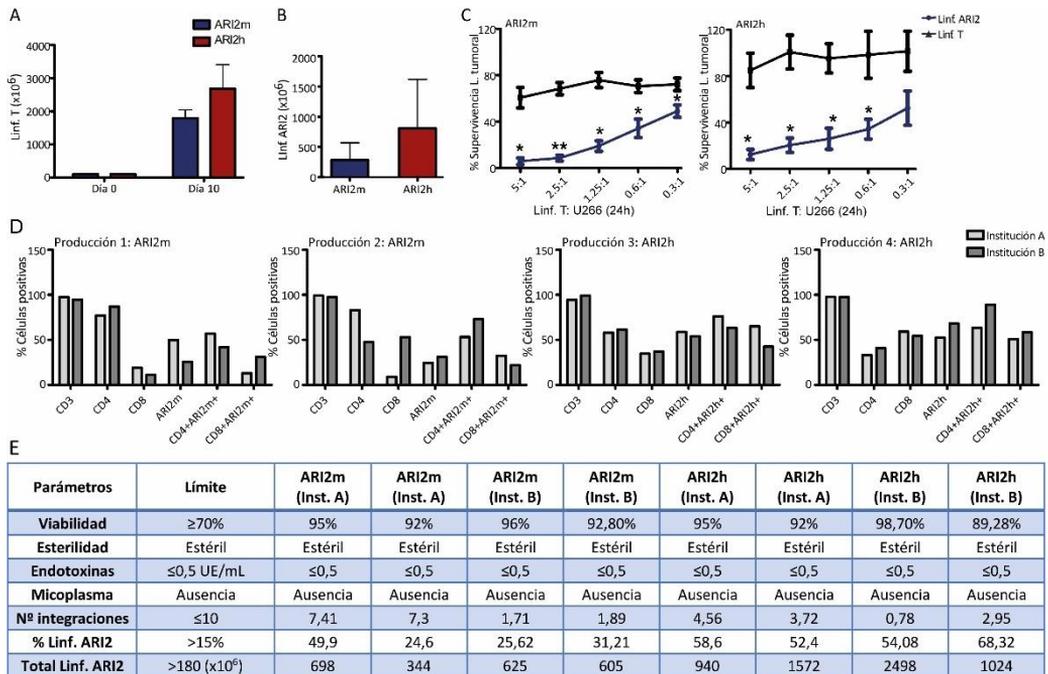
**Figura 23:** Imágenes de microscopía confocal. Las células tumorales teñidas con CMAC (azul) y el BCMA con monoclonal anti-BCMA (verde) (A). Imágenes de la película de confocal las células MM sobreexpresando BCMA-GFP (verde) y los linfocitos T en CMAC (azul) (B-C). Cuantificación de Linf. T tras co-cultivo con células tumorales sobreexpresando el BCMA-GFP con o sin Latrinculin A (Lat-A) que expresan BCMA-GFP en su membrana (D). Dibujo explicativo y citotoxicidad de los Linf. ARI2m a las 48h tras ser co-cultivados durante 2 horas con células tumorales (D). \* $p < 0.05$ .

#### 4. Producción de ARI2m y ARI2h para un ensayo clínico fase-I/II en pacientes de MM

Los estudios realizados en el transcurso de esta tesis han sido utilizados para poder llevar a cabo un ensayo clínico multicéntrico Fase I/II en pacientes de MM tratados con células ARI2h (EudraCT code: 2019-001472-11) siendo el promotor el Hospital Clínic de Barcelona. En este ensayo clínico participan cinco instituciones sanitarias (el Hospital Clínic de Barcelona, la Clínica Universitaria de Navarra, el Hospital Universitario de Salamanca, el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla y el Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia) siendo el Hospital Clínic de Barcelona y la Clínica Universitaria de Navarra los centros productores de células ARI2h. Los siguientes resultados son parte de la documentación presentado a la agencia española del medicamento (AEMPs) para la aprobación de este ensayo.

Inicialmente se comprobó la capacidad de producción a gran escala y de grado clínico de linfocitos ARI2m y ARI2h en los dos centros productores. Para ello, se realizaron 4

expansiones de cada producto, es decir dos de ARI2m y dos de ARI2h, en dos instituciones distintas, el Hospital Clínic de Barcelona y la Clínica Universitaria de Navarra. Para la producción se usó el sistema Prodigy (Milteny Biotec), un sistema cerrado que permite la obtención de suficientes linfocitos T infectados y expandidos para tratar un paciente. En las cuatro expansiones se obtuvo un número total de linfocitos T (Fig. 24A) conteniendo un número suficiente de Linf. ARI2m/ARI2h para un paciente, ya que dosis mínima requerida tiene que ser superior a  $150 \times 10^6$  Linf. ARI2 (Fig. 24B). También se comprobó que la actividad citotóxica de ambos CARTs era superior a la de los Linf. T control (Fig. 24C). Por último, se comprobó la obtención en las producciones de células CART fenotipos similares en ambas instituciones (Fig. 24D) y todas las producciones alcanzaron el umbral mínimo requerido en distintos parámetros para el lanzamiento del producto (Fig. 24E).



**Figura 24:** Producción eficiente de Linf. ARI2m y ARI2h para la clínica. Expansión total de Linfocitos T de las producciones Linf. ARI2m y ARI2h (A) y el total de CARTs de cada producción (B). Ensayos de citotoxicidad de los Linf. T expandidos co-cultivados con células U266 (MM) tras 24h (C). Comparación de fenotipo y porcentaje de CAR obtenido de cada subpoblación analizada por los dos centros (D) y comparativa de los parámetros de lanzamiento de producto obtenido por los dos centros (E). \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.0001$ .

Por último, la AEMPs requirió comprobar que los linfocitos T transducidos con ARI2h no ejercían ningún tipo de citotoxicidad frente a otras células BCMA negativas, ya que la parte de reconocimiento de nuestro ARI2h difiere en varios aa a los CART anti-



**Figura 25:** Cuantificación de BCMA en superficie (A) y ensayo de citotoxicidad de distintas líneas tumorales (B).



# Resultados

2º estudio



## 5. Diseñar un método eficiente para la transducción de células NK derivadas de sangre de cordón umbilical (CB-NK).

Las células NK tienen una actividad citotóxica per se frente a las células tumorales, debido al reconocimiento de estas no mediado por el CMH-I. En concreto, las CB-NK no causan EICH y es factible obtener un gran número de células de una sola unidad de cordón umbilical, por ello pueden ser una muy buena fuente células inmunes para la producción de un CAR.

El principal problema para la obtención de células CAR-NK es conseguir un protocolo de infección de CB-NK óptimo. Nosotros hemos escogido un método de infección basado en lentivirus, en vez de retrovirus por ser más seguros en el manejo. Por tanto, en la primera parte de estos resultados se resumen las distintas modificaciones en el vector que codifica para el CAR-CB-NK y los protocolos de infección probados para optimizar el método de transducción de CB-NK mediante lentivirus.

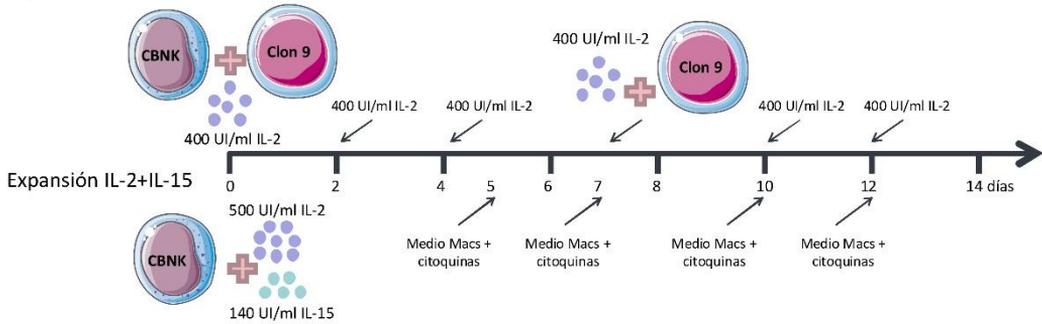
Para estudiar la actividad de un CAR-CB-NK, nos basamos en el CART-CD19 (ARI0001) diseñado y evaluado previamente en nuestro centro<sup>185</sup>. Inicialmente, partimos de los mismos vectores y protocolos usados con ARI0001 obteniendo porcentajes de infección muy bajos de menos del 10% (Figura 27-A). Por tanto, tras una amplia búsqueda de nuevos protocolos, se identificaron varios factores que podían interferir en el porcentaje de infección de las CB-NK como son el método de expansión, el promotor del vector de interés y/o el tipo de adyuvantes usados durante la transducción. Además, de otras variables más comunes como la MOI empleada o el realizar dobles o triples infecciones seguidas en vez de una sola infección.

Inicialmente, el método de expansión de las CB-NK en nuestro laboratorio se basa en el co-cultivo de las CB-NK con aAPCs irradiadas, en concreto denominadas Clon 9 (C9), más la adición exógena de IL-2 (explicado ampliamente en material y métodos) (Figura 26A). Sin embargo, con este método hasta el día 6-7 de expansión hay células C9 en el cultivo que también adquieren el virus durante la transducción con más facilidad que las CB-NK al ser una línea celular, disminuyendo por tanto la eficiencia de infección de las CB-NK con el CAR. Por tanto, decidimos probar otro método de expansión sin aAPCs, solo con medio específico para la expansión de NKs (NK Macs Media, Milteny Biotec) y la adición de citoquinas IL-2 y IL-15 (Figura 26A). Respecto a la expansión con los distintos métodos empleados (C9 vs IL-2+ IL-15), en la expansión de CB-NK mediante aAPCs obtuvimos un mayor número de CB-NK totales (Figura 26B), mientras que con el método de IL2+ IL15 obtuvimos un menor número de células CB-NK, pero que presentaron una mayor citotoxicidad frente a líneas

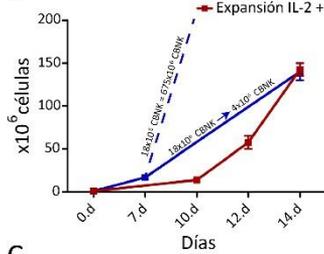
tumorales de MM (Figura 26C). Además, observamos que el fenotipo en cuanto los receptores de CB-NK fue distinto en función del método de expansión, siendo más consistente la expresión de CD56 y Nkp44 para las CB-NK expandidas con citoquinas que con C9, y la expresión de NKG2D mayor con C9 que con citoquinas. (Figura 26D).

A

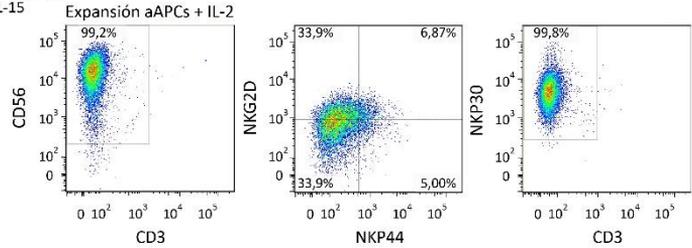
Expansión aAPCs + IL-2



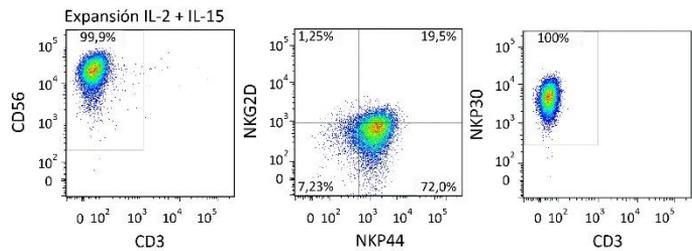
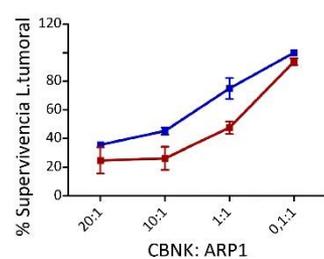
B



D

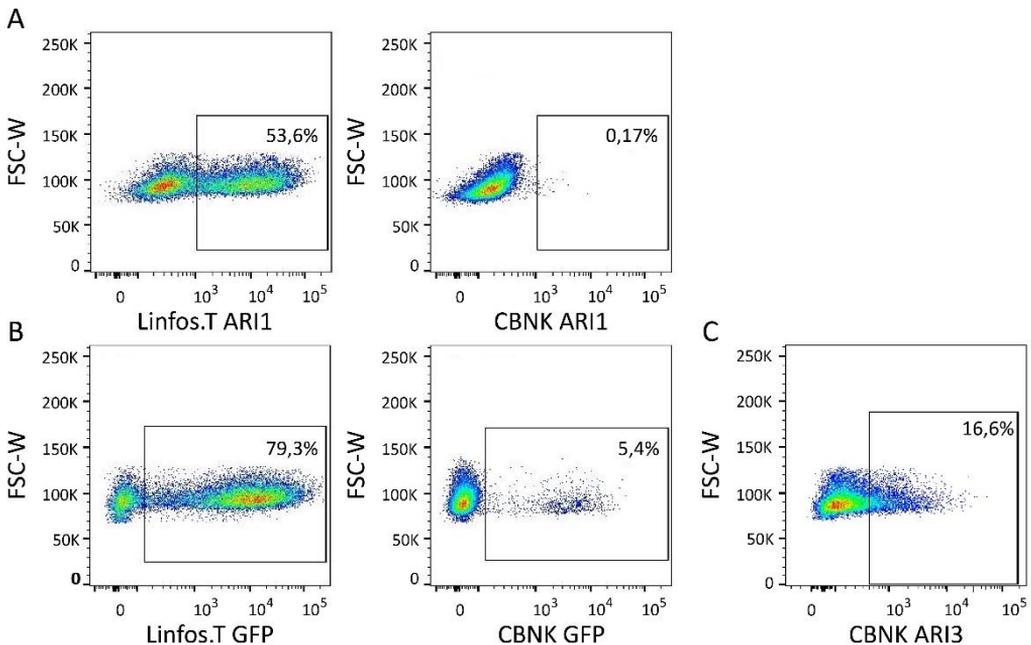


C



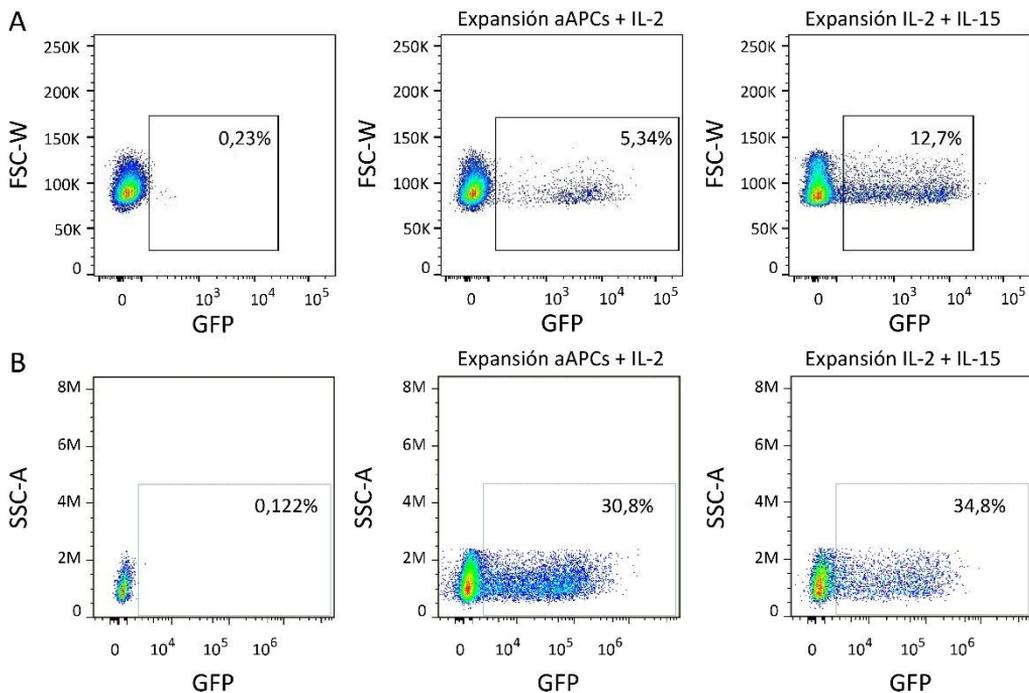
**Figura 26:** Comparativa de los dos métodos de expansión de las CB-NK. Diagrama de la expansión de las CB-NK (A) usando aAPCs (células presentadoras de antígeno artificiales) irradiadas + IL-2 o usando citoquinas IL-2+ IL-15 y medio NK Macs. Número de células CB-NK obtenidas tras la expansión durante 14 días (B). En la expansión con aAPCs a día 7 había un total de  $18 \times 10^6$  CB-NK, pero se siguió con  $4 \times 10^6$  CB-NK, mismo número de células que en el grupo expandido con IL-2+IL-15. En línea discontinua se observa el valor teórico si se hubiese seguido con los  $18 \times 10^6$  CB-NK, alrededor de  $675 \times 10^6$  CB-NK. Citotoxicidad de CB-NK frente a la línea de MM ARP1 (C). Fenotipo de las CB-NK (CD56, NKG2D, Nkp30 y Nkp44) según los dos métodos de expansión (D).

El promotor usado en el constructo de ARI0001 al igual que en el constructo de ARI2, es el promotor EF1- $\alpha$ , un promotor muy usado para transducir linfocitos<sup>140,186</sup>. Pero hay otros promotores más fuertes, es decir, que producen una mayor señal del vector transducido o que se expresan mejor en células embrionarias como es el promotor MSCV (*Murine stem cell virus*)<sup>187</sup>. Este promotor lo usamos en nuestro grupo en el vector que expresa la GFP en las líneas tumorales. Por tanto, primero decidimos hacer una prueba infectando los linfocitos T y las CB-NK tanto con el vector pccL-EF1 $\alpha$ -CD19HA-CD8a-41BB-CD3 $\zeta$  (Figura 27A) como con el vector pLV\_MSCV\_Luc-T2A-GFP (Figura 27B) comprobando que el porcentaje de infección era mayor en ambos casos usando el vector pLV\_MSCV\_Luc-T2A-GFP (Figura 27B). Por ende, sustituimos el promotor EF1 $\alpha$  por el MSCV en el constructo ARI0001 obteniendo un nuevo constructo pCCL\_MSCV\_19HA-CD8a-41BB-CD3 $\zeta$  y una mayor infección en las CB-NK. Este constructo se denominó, ARI3 (Figura 27C).



**Figura 27:** % Infección de Linf.T y CB-NK según el promotor utilizado. Los Linf. T y las CB-NK transducidas con el vector pccL\_EF1 $\alpha$ -A3B1 que codifica para el CAR ARI0001 (A). Linf. T y CB-NK transducidas con el vector pLV\_MSCV\_GFP que codifica para la expresión de GFP (B). CB-NK transducidas con el vector pccL\_MSCV\_A3B1 que codifica para el CAR ARI3 (C).

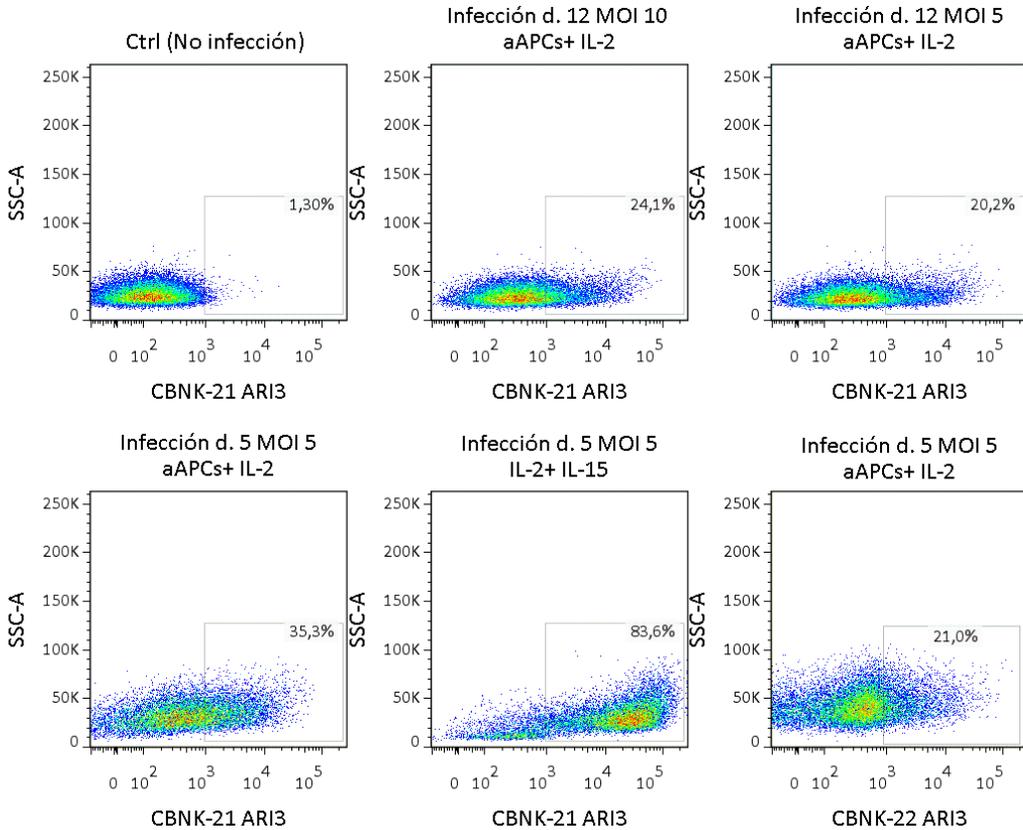
Por último, decidimos someter las CB-NK a una doble infección y probar la vectofusina como nuevo adyuvante de infección en vez del polybrene, obteniendo un porcentaje de infección del 5% y el 12% según si la expansión se realizó con aAPC o con citoquinas, respectivamente en la primera infección (Figura 28A) y un 30,8% y un 34,8% tras la segunda infección respectivamente (Figura 28B).



**Figura 28:** Comparativa de los porcentajes de transducción con el vector pLV\_MSCV\_GFP que codifica para GFP en las CB-NK usando vectofusina y tras una infección (A) o una doble infección (B). En los dos *dotplots* de la izquierda encontramos las CB-NK sin transducir como controles, en el medio las CB-NK expandidas con aAPCs más IL-2 y en la derecha CB-NK expandidas con citoquinas IL-2 más IL-15.

Aunque los resultados fueron más positivos con la doble infección y el uso de vectofusina, los porcentajes de infección seguían siendo más bajos que en los linfocitos T, obteniendo un rango de entre 10-40% de infección dependiendo también de la unidad de sangre de cordón umbilical. Por ello, contactamos con el grupo del Dr. Verhoeyen de Lyon<sup>188</sup>, que había publicado varios estudios demostrando que el uso del *envelope* BaEV es más óptimo que el *envelope* VSV-G, para la producción lentiviral y posterior transducción de NK<sup>189</sup>. El VSV-G entra en las células a infectar mediante la unión con el receptor LDL-R que no está presente ni en los linfocitos T ni en las NK si están inactivas, pero cuando los linfocitos T son activados si expresan LDL-R mientras que las NK siguen sin expresarlo. Por tanto, el vector VSV es muy poco eficiente para infectar las NK, motivo por el cual, debíamos usar una MOI muy elevada produciendo una alta mortalidad en las NK para finalmente conseguir un mínimo porcentaje de infección. En cambio, el *envelope* BaEV entra en las células mediante otro tipo de receptor, el ASCT-2 que si se expresa tanto en linfocitos T como en células NK activadas<sup>190</sup>.

Por tanto, se llevó a cabo la puesta a punto de una nueva producción viral con el vector *envelope* BaEV-TR. Volvimos a realizar una serie de pruebas de infección comprobando que dependiendo del método de expansión de CB-NK, la MOI y el propio cordón obteníamos infecciones des de un 20% hasta infecciones realmente altas como alrededor de un 80%. Además, observamos que la infección a día 5 de la expansión obtenía mejores resultados que a día 12. (Figura 29).

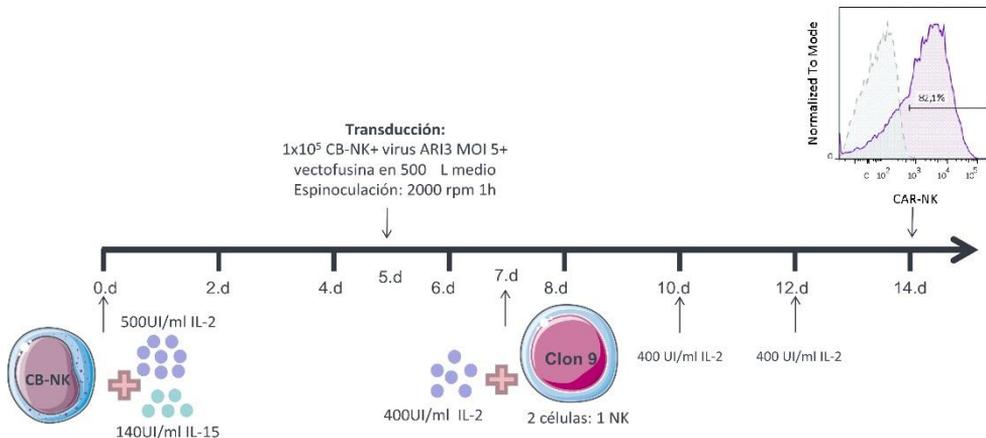


**Figura 29:** Infección de las CB-NK-21 (cordón número 21) y las CB-NK-22 (cordón número 22) a dosis de MOI 5 y 10 y con los dos métodos de expansión (aAPC+ IL-2 vs IL-2+ IL-15).

Finalmente, tras probar todos los métodos de expansión e infección, el método más eficiente con el que obtuvimos alrededor de un 80% de infección y conseguimos un número de CAR-NK suficientes para realizar un experimento *in vivo* fue el siguiente (Figura 30).

A partir de una unidad de cordón de sangre umbilical fresco, se seleccionan las NK y se expanden con el medio especial NKMACS (Milteny Biotec) suplementado con citoquinas (IL-2 e IL-15) durante 5 días en una placa de 24 pocillos ( $1 \times 10^6$  células CB-NK/mL). En el 5º día se realiza la infección de  $5 \times 10^5$  CB-NK/ pocillo con el virus ARI3 a

MOI 5 + vectofusina (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en un total de 500  $\mu\text{L}$  de medio sin completar y espinoculación a 2.000 rpm durante 1 h. Pasadas 6-8 h de la infección se lavan las células y se vuelven a dejar en cultivo con medio NKMACS durante 48h. El 7<sup>o</sup> día se cuentan las células y se sigue la expansión con medio CLICKs más C9 irradiado a una ratio 1:2 (NK: C9) e IL-2 durante 7 días. En el día 14 de la expansión se analiza el porcentaje de CAR-NK y se utilizan para los ensayos *in vitro* / *in vivo* pertinentes.



**Figura 30:** Método eficiente de expansión y transducción de las CB-NK.

## 6. Análisis de la actividad y eficacia de un CAR-NK frente a CD19 (ARI3) para el tratamiento del LNH.

Inicialmente, estudiamos la actividad citotóxica *in vitro* de las CB-NK y las CAR-NK ARI3 vs un CART (ARI0001) frente a la línea de LNH de Burkitt Ramos. Primero, se verificó que la actividad de las CAR-NK ARI3 era mayor que la actividad *per se* de las CB-NK (Figura 31A), aunque se observa, que a medida que se reduce la ratio célula efectora: diana, la actividad del CAR-NK ARI3 pierde eficacia (Figura 31B). Asimismo, observamos que la actividad del CAR-NK ARI3 en comparación con la actividad citotóxica del CAR-T ARI0001 es solo mayor a ratios altos (Figura 31A-B) mientras que a ratios bajos la actividad del CAR-T ARI0001 es superior (Figura 31B).

En segundo lugar, debido a que las NK requieren IL-2, y nuestro constructo no presenta esta adición, decidimos añadir exógenamente IL-2 a las CAR-NK. La adición de IL-2 (100 UI/mL) al ensayo mejoró considerablemente la citotoxicidad del CAR-NK ARI3 obteniendo una actividad anti-tumoral muy parecida al CAR-T ARI0001 (Figura 31B).

Por último, una vez comprobada la mayor actividad del CAR-NK+IL-2, quisimos estudiar si la unión de ambas poblaciones inmunes (CAR-T y CAR-NK) podía aumentar la actividad total anti-tumoral. Además, hipotetizamos que esta unión de poblaciones

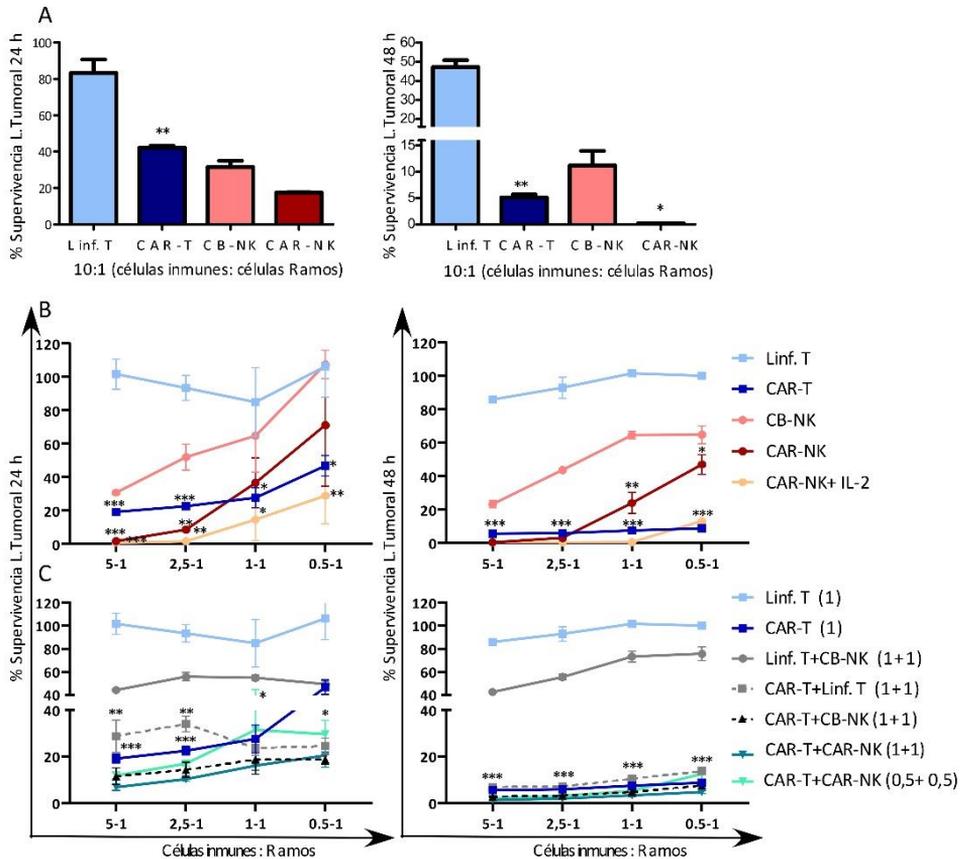
podría mantener la actividad del CAR-NK sin necesidad de añadir exógenamente IL-2, ya que los Linf. T/ CAR-T son una fuente de secreción de IL-2. Analizamos tanto una adición 1+1 (CAR-T+CAR-NK) en la que hay el doble de células inmunes que en la condición CAR-T (1) como la adición 0,5+0,5 que contiene en total el mismo número de células inmunes que la condición CAR-T (1). Como controles de células inmunes totales analizamos también la combinación de células CAR-T+Linf. T (1+1) y células CAR-T+ CB-NK (1+1).

La actividad citotóxica a 24 h muestra la mayor actividad del CAR-NK frente a las CB-NK, y que la adición de IL-2 ayuda a la actividad anti-tumoral de las CAR-NK (Figura 31B).

Con respecto a las combinaciones de células inmunes, observamos que CAR-T+CB-NK (1+1) y CAR-T+ CAR-NK (1+1) tienen una actividad anti-tumoral igual a la actividad *per se* del CAR-T (1) o superior a ratios bajos como 0,5:1 y tiempos tempranos (Figura 31C). Cabe destacar que, en este caso, las combinaciones CAR-T+ CB-NK (1+1) y CAR-T+ CAR-NK (1+1) tienen el doble de células inmunes que la condición CAR-T (1) o la combinación CAR-T+CAR-NK (0,5+0,5). Curiosamente, la actividad anti-tumoral es igual tanto en la combinación de CAR-T+CB-NK (1+1) que con la combinación CAR-T+ CAR-NK (1+1) demostrando una mayor actividad anti-tumoral entre ambas poblaciones inmunes que una población sola. Además, la combinación CAR-T+CAR-NK (0,5+0,5) con el mismo número de células inmunes que la condición CAR-T (1) mantiene una actividad citotóxica igual o incluso superior a ratios bajos que el CAR-T (Figura 31C) demostrando que la combinación de ambas poblaciones a tiempos tempranos (24 h) es efectiva.

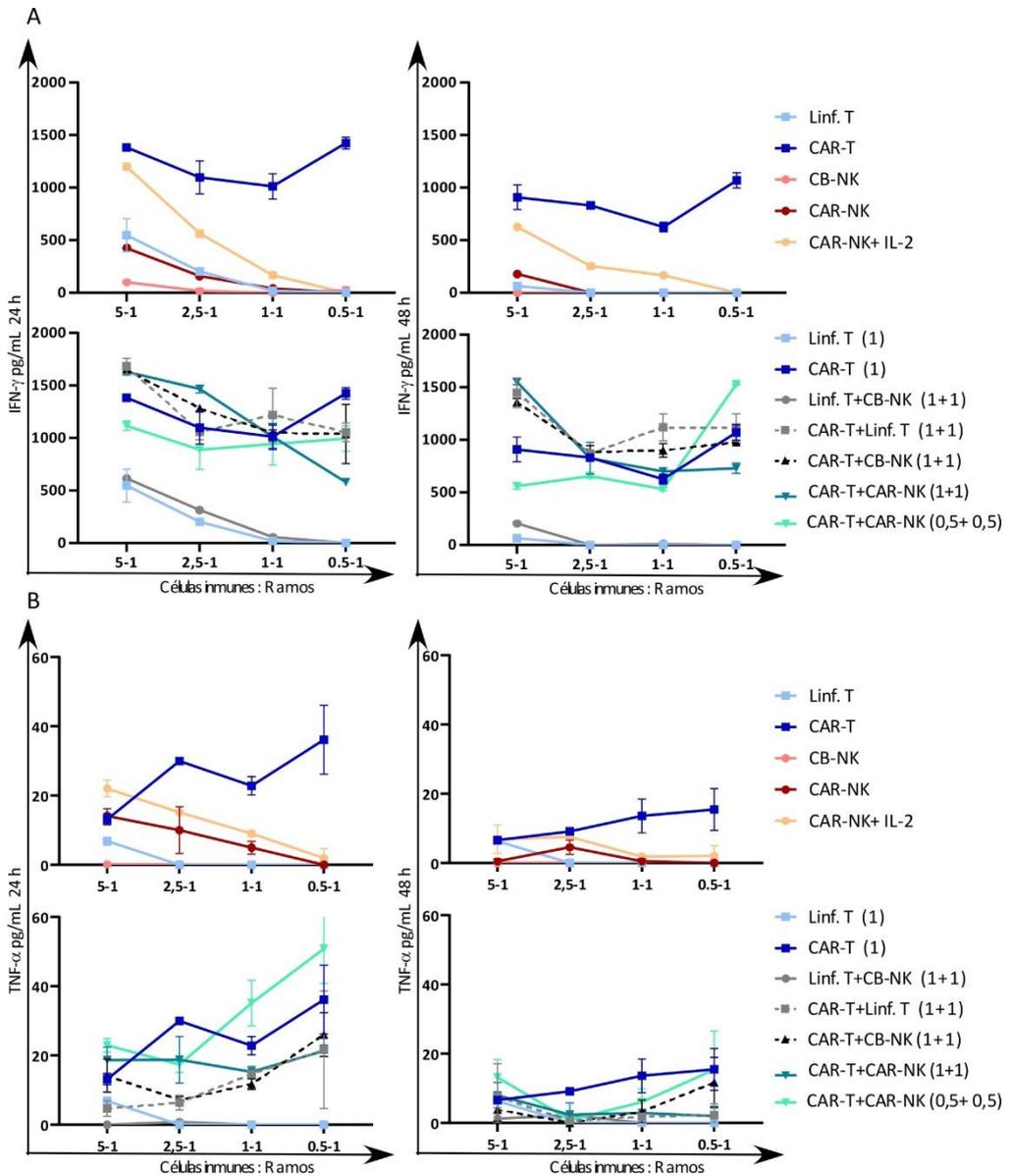
Además, también quisimos estudiar la secreción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en todas estas condiciones. Los resultados demuestran que tanto la producción del IFN- $\gamma$  como del TNF- $\alpha$  es superior a 24 que 48 h. Respecto al IFN- $\gamma$ , observamos una mayor secreción de IFN- $\gamma$  en el grupo CAR-NK y CAR-NK+IL-2 vs las CB-NK (Figura 32A) al igual que en la actividad citotóxica. Respecto a la comparación de CAR-T vs CAR-NK, la secreción de IFN- $\gamma$  en el grupo CAR-T es mayor que en CAR-NK+ IL-2 (Figura 32A) a pesar de que el grupo CAR-NK+IL-2 no presenta una actividad citotóxica inferior al grupo CAR-T (Figura 31B).

Respecto a las combinaciones, en los grupos 1+1 donde hay un mayor número de células inmunes y a ratios altos (5:1) se observa una mayor secreción de IFN- $\gamma$  (Figura 32A).



**Figura 31:** Comparativa de la citotoxicidad de los CAR-T ARI0001 vs CAR-NK ARI3 a ratio alto (10:1 de células inmunes frente la línea tumoral Ramos) (A). Comparativa de CAR-T ARI0001 vs CAR-NK ARI0001 vs CAR-NK+IL-2 a ratios bajos (5-1 a 0,125:1) (B). Supervivencia de la línea tumoral Ramos de 24-96h (C) frente a las distintas combinaciones de células inmunes. El grupo Linf. T (1), CAR-T (1) y CAR-T+CAR-NK (0,5+0,5) tienen el mismo número de células inmunes y la mitad que en los grupos CAR-T+Linf. T (1+1), CAR-T+CB-NK (1+1) y CAR-T+CAR-NK (1+1). El grupo CAR-T y todas las combinaciones se han analizado respecto al grupo Linf. T. Los grupos CAR-NK y CAR-NK+IL-2 respecto al grupo CB-NK. \* $p < 0,01$ . \*\*  $p < 0,001$ . \*\*\*  $p < 0,0001$ . La estadística representada en C a 48 h indica la comparativa entre todos los grupos por debajo de los asteriscos frente el grupo Linf. T.

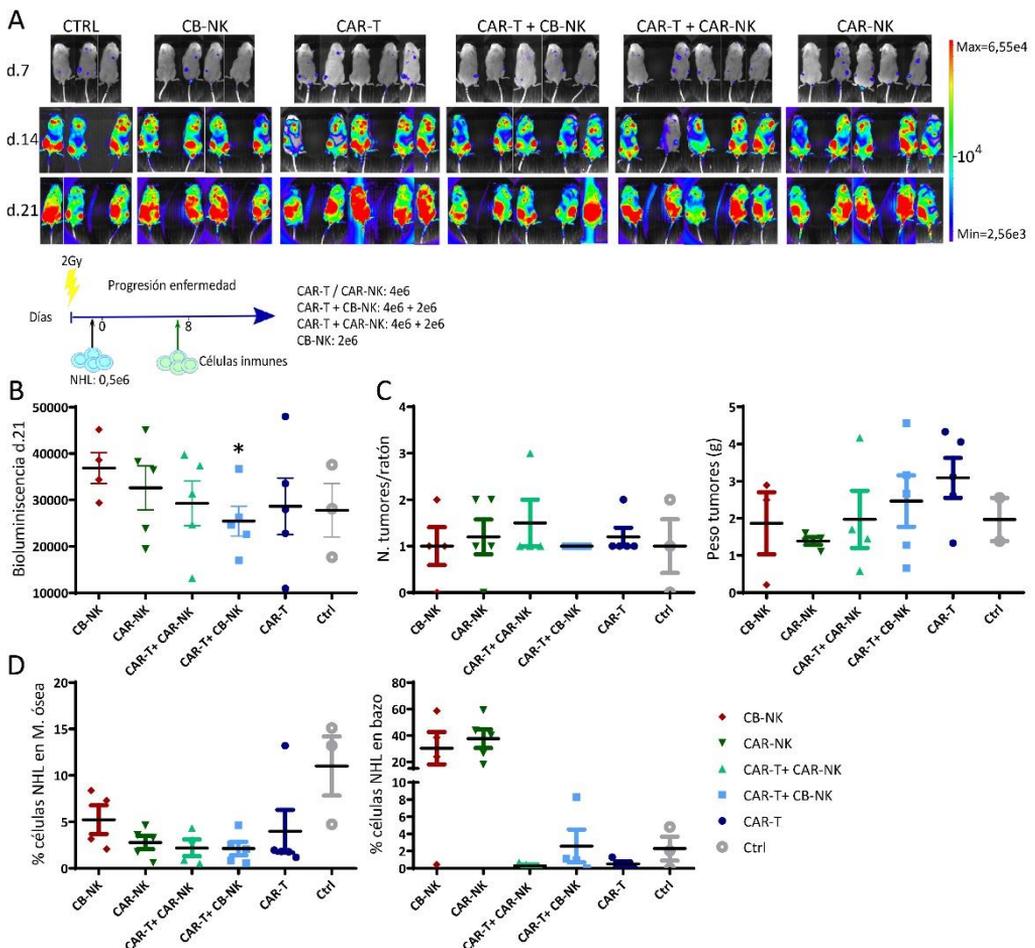
La secreción de  $TNF-\alpha$  rápida y temprana apenas se detecta a 48 h siendo la condición CAR-T la que presenta una mayor secreción. Se observa una mayor secreción de  $TNF-\alpha$  tanto CAR-NK como CAR-NK+IL-2 con respecto a CB-NK, al igual que en su actividad citotóxica (Figura 32B). El grupo CAR-T presenta una mayor secreción de  $TNF-\alpha$  que todos los grupos CAR-NK (Figura 32B). Con respecto a las combinaciones no se observan grandes diferencias respecto al grupo CAR-T (Figura 32B).



**Figura 32:** Cuantificación de la secreción de las citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Cuantificación del IFN- $\gamma$  del CAR-T, CAR-NK y sus distintas combinaciones a las 24 y 48 h (A). Cuantificación del TNF- $\alpha$  del CAR-T, CAR-NK y sus distintas combinaciones (B).

## 7. Comparativa de la actividad y eficacia de un CART19 vs un CARNK19 para el tratamiento del LNH *in vivo*

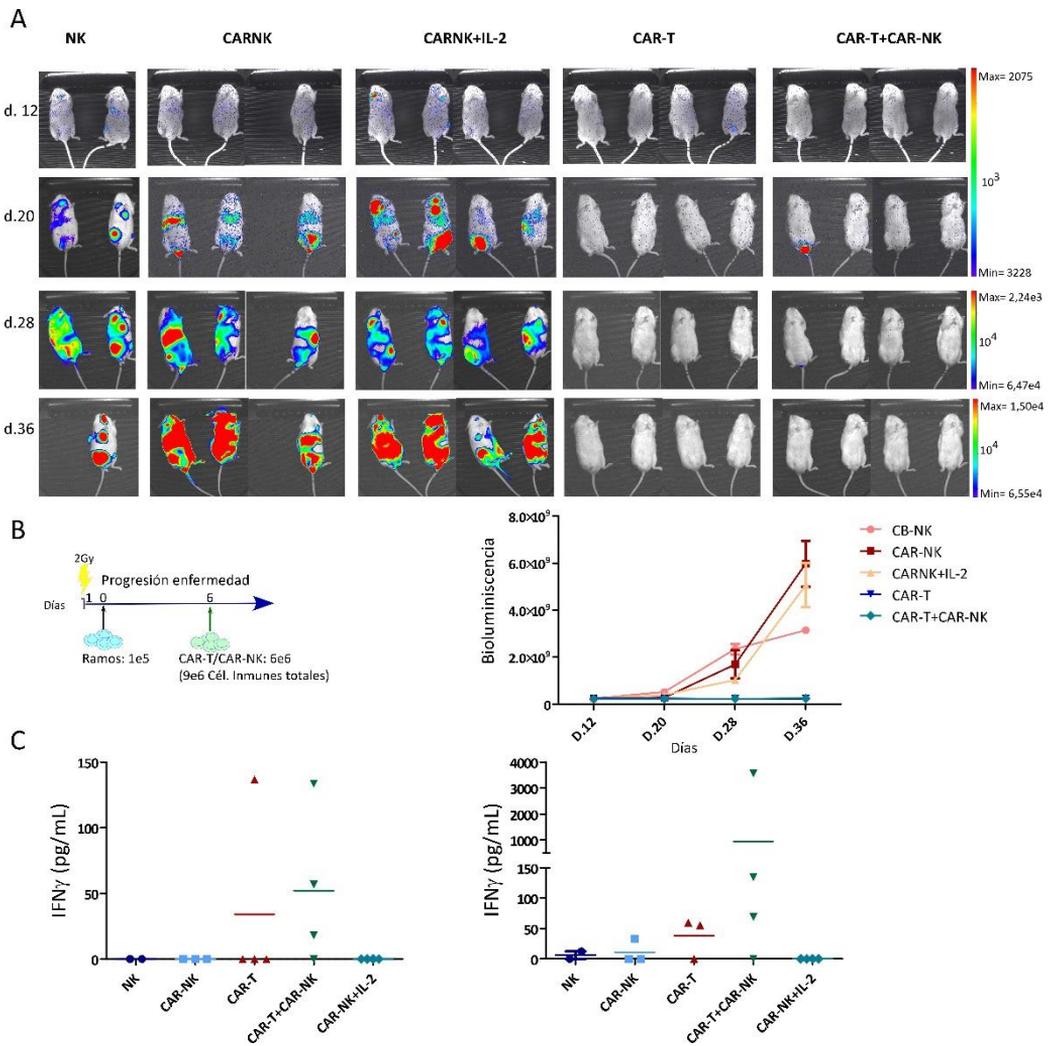
Para confirmar si las células CAR-NK mantenían una actividad superior anti-tumoral a las CB-NK e indagar sobre su superioridad o no respecto a los CAR-T realizamos dos experimentos *in vivo* en un modelo murino de LNH. En el primer estudio *in vivo* no se pudieron obtener resultados concluyentes ya que la dosis celular tumoral inyectada proliferó rápidamente en el ratón y a las dos semanas ningún grupo pudo controlar la enfermedad (Figura 33A). A pesar de que ningún grupo pudo contener la progresión de la enfermedad, observamos que la combinación de CAR-T con CB-NK es la que mostró menor progresión de la enfermedad (Figura 33B). Hay que resaltar que los grupos con combinaciones tenían un número total mayor de células inmunes.



**Figura 33:** Imágenes del seguimiento por bioluminiscencia de la progresión tumoral en los distintos grupos (A). Cuantificación de la señal de bioluminiscencia (B), así como el número de tumores encontrados en cada grupo y su peso (C). % de células tumorales en médula ósea y bazo a punto final (D). Estadística gráfica bioluminiscencia d.21: CB-NK como control \* $p < 0,05$ .

Observamos además que al progresar la enfermedad rápidamente se desarrollaron un amplio número de tumores en los ratones. Analizamos el peso y número de tumores por ratón, observando que el grupo tratado con CAR-T presentó un mayor peso total de tumores (Figura 33C). Además, el grupo con menor progresión de la enfermedad (CAR-T+CB-NK) y la combinación CAR-T+CAR-NK mostraron un menor porcentaje de células tumorales en la médula ósea (Figura 33D). Inesperadamente, observamos que en los grupos tratados con CB-NK o CAR-NK (ambos sin IL-2) hay una alta migración de células tumorales en el bazo y que el grupo tratado con CAR-T+CAR-NK fue el que mostró menos células tumorales en el bazo. (Figura 33D).

En el siguiente experimento *in vivo* infundimos  $1 \times 10^5$  células Ramos en el día 0 y tratamos los ratones a día 7 con los distintos grupos de células inmunes. En esta ocasión quisimos añadir el grupo de CAR-NK+IL-2 para comprobar si la adición de IL-2 (3 veces por semana) mejoraba la actividad citotóxica de las CAR-NK *in vivo* tal y como habíamos visto *in vitro*. Observamos una mayor contención de la enfermedad tanto del grupo CAR-NK como del grupo CAR-NK+IL-2 respecto al grupo control CB-NK las dos primeras semanas de tratamiento (Figura 34A). Sin embargo, ambos grupos no pudieron eliminar la enfermedad, teniendo que ser sacrificados al mismo tiempo que el grupo tratado con CB-NK, en el día 36 tras 4 semanas de tratamiento. Por otro lado, los grupos CAR-T y CAR-T+CAR-NK si consiguieron eliminar la enfermedad. Todos los grupos del ensayo tenían el mismo número de células inmunes, por tanto, en el grupo CAR-T+CAR-NK, la suma de ambas poblaciones contiene el mismo número de células que en el grupo CAR-T. Además, en el día 25 y 33 del tratamiento se cuantificó la presencia de IFN- $\gamma$  en sangre de los ratones, obteniendo en ambos casos que el grupo CAR-T+CAR-NK era el grupo con mayor secreción de IFN- $\gamma$ .





# Discusión



## 1r Estudio

La proteína BCMA fue identificada como un antígeno muy prometedor para ser usado en la terapia CART para tratar pacientes de MM en 2013<sup>115</sup>. Des de entonces, varios estudios se han ido relevando en el tiempo<sup>123,102</sup>, permitiéndonos el diseño y desarrollo de nuestro propio CARTBCMA (ARI2) y su versión humanizada (ARI2h), ambos demostrando una alta actividad anti-mieloma. Todos los ensayos *in vitro* e *in vivo* de esta tesis han sido la base para un ensayo clínico multicéntrico para pacientes de MM con el producto ARI2h en España (Código EudraCT del ensayo clínico: 2019-001472-11).

El éxito del antígeno BCMA como diana en la terapia CART fue demostrado por primera vez en pacientes con un CART-BCMA con CD28 como dominio co-estimulador<sup>116</sup>. Sin embargo, este CAR mostro una serie de toxicidades en pacientes como hipotensión, altos niveles de IL-6 o un incremento de la creatinina fosfoquinasa en suero. Además, para conseguir una respuesta objetiva los pacientes fueron tratados con dosis de  $3-9 \times 10^6$ /Kg de CARTBCMA, mientras que en la terapia CART19 se usan  $1-2 \times 10^6$ /kg de CARTs. Esta diferencia puede deberse según los autores del estudio a una posible expresión más débil del BCMA en comparación con el CD19, a la presencia del sBCMA en el suero o bien al dominio co-estimulador usado, el CD28. De hecho, en la siguiente fase del ensayo clínico el CD28 es reemplazado por el 4-1BB demostrando una toxicidad más manejable y una dosis mínima de  $150 \times 10^6$  células CART para obtener respuestas objetivas<sup>123</sup>. Varios estudios<sup>85,191</sup> realizados de CART19 con los dominios co-estimuladores CD28 y 4-1BB demuestran que una alta activación de las células CART debido a una alta afinidad frente al antígeno, una alta expresión de este o que el CAR contenga CD28, conlleva una alta y temprana proliferación del CART que a la vez provoca un mayor agotamiento y una menor persistencia. Por otro lado, una activación más tardía debido a una menor afinidad al antígeno diana o escoger el 4-1BB como dominio co-estimulador reduce el agotamiento de las células CART y por tanto aumenta su persistencia. Esta diferencia entre ambos dominios co-estimuladores se cree que es debida por el fenotipo que adquieren los linfocitos T, el CD28 confiere a las células CART un fenotipo más de tipo célula efectora mientras que el 4-1BB confiere un fenotipo más de célula de memoria<sup>191</sup>. Además, hay estudios que sugieren que el perfil fenotípico de los linfocitos de pacientes respondedores a la terapia CARTBCMA corresponde a linfocitos T menos diferenciados con una mayor ratio de células *naïve* o de memoria<sup>192</sup>. Nuestros dos constructos CARTs ARI2m y ARI2h contienen el mismo dominio co-estimulador 4-1BB y presentan la misma afinidad frente al antígeno BCMA. Sin embargo, las células ARI2h presentan una

cinética más lenta y a la vez han demostrado una mayor eficacia y persistencia frente a un modelo murino de enfermedad con una alta carga tumoral.

Además, del tipo de dominio co-estimulador, hay más factores que pueden influir en la actividad del CART. Por ejemplo, en estos dos estudios<sup>122,192</sup> demostraron que un número menor de tratamientos previos a la terapia CART mejora la respuesta a este y que la expansión de los CARs es mejor tras un régimen de linfodeplección. Los pacientes de MM suelen enlazar un tratamiento con otro de forma indefinida, tratamientos que, en muchos casos, pueden afectar al estado de sus linfocitos y por consiguiente no presentar unos linfocitos T óptimos para una terapia CART. Por tanto, un menor número de tratamientos previos a la terapia CART puede influir positivamente en la calidad de los linfocitos T. Por ello, una nueva estrategia por parte de los clínicos es plantearse recoger un número suficiente de linfocitos T en las primeras fases de tratamientos o primer auto- trasplante, para que, si más adelante fuese necesario realizar una terapia CART, partir de unos linfocitos T menos tratados. Respecto al tratamiento linfodepletivo previo a la terapia CART, suele estar basado en fludarabina y/o ciclofosfamida, este régimen no es imprescindible, pero mejora considerablemente la expansión del CART porque aumenta el injerto de este en el paciente y elimina posibles poblaciones inmunosupresoras<sup>192</sup>. Por tanto, distintos factores influyen en la expansión y persistencia de los CARTs para controlar la enfermedad a largo plazo, hecho de vital importancia para disminuir el número de pacientes de MM que acaban recayendo tras esta terapia.

Otro motivo por el cual un CART perdura más o menos tiempo en el paciente puede deberse a si su scFv está constituido por un anticuerpo murino o al contrario el anticuerpo esta humanizado o incluso es totalmente humano. Los resultados publicados con distintos tipos de CARs siguen la misma dirección de implantar CARs humanos<sup>77</sup> o humanizados<sup>119</sup> para evitar la pérdida temprana del CAR. Esta pérdida se cree que podría suceder cuando la parte no humana de un anticuerpo murino es reconocida y se crea una reacción inmunológica del sistema inmune del paciente frente a la región murina del scFv disminuyendo la persistencia de las células CART. Por tanto, basándonos en estudios anteriores y soportado por nuestros resultados demostrando que ambos CARTs ARI2m y ARI2h son iguales en su función anti-tumoral, se decidió el ARI2h para su uso clínico en pacientes de MM.

Otra cuestión relevante y con más controversia es el análisis del sBCMA en la actividad del CARTBCMA, debido a que varios estudios aseguran que el sBCMA no afecta a la actividad del CARTBCMA<sup>115,116,141</sup>, mientras que otros incluidos el nuestro si han señalado una disminución de la actividad del CARTBCMA debido al sBCMA<sup>193</sup>.

Entre los estudios que defienden que el sBCMA no afecta la actividad del CART se encuentra el primero de ellos, dónde demuestran mediante ELISA co-cultivando CART+MM+ proteína BCMA que los niveles de IFN- $\gamma$  no disminuyen<sup>115</sup>. Sin embargo, los niveles de proteína BCMA (150 ng/mL) señalan ser 10 veces superiores a la media encontrada en pacientes mientras que en nuestros estudios la media de sBCMA encontrada en pacientes es alrededor de 100 ng/mL. Además, en el primer estudio clínico de pacientes tratados con un CARTBCMA confirman que el sBCMA no afecta a la actividad del CART porque también obtienen respuesta de los pacientes con altos niveles de sBCMA en plasma, pero a la vez, sugieren que la necesidad de una mayor dosis de células CART en comparación con otros estudios puede ser debida a la presencia de sBCMA<sup>116</sup>. Nosotros comprobamos que en ensayos de citotoxicidad *in vitro* a corto tiempo la rápida actividad del CART eliminando las células de MM impide analizar detalladamente el factor del sBCMA en estudios preclínicos. Sin embargo, en nuestro modelo *in vitro* de citotoxicidad basado en una fuente continua de liberación de BCMA a una ratio CART-BCMA: MM baja si se confirma que el sBCMA afecta negativamente la actividad del CARTBCMA. Para ello es necesario estudiar esta inhibición del sBCMA mediante inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa con fármacos como el DAPT. Además, observamos que el BCMA es secretado mediante vesículas distrayendo las células CART de su diana y que el BCMA puede ser transferido de las células tumorales a las células CART mediante trogocitosis, hecho ya observado en las células CART-19, causando una disminución de la actividad anti-mieloma del CAR-T. Por tanto, creemos que el sBCMA si afecta la actividad del CART *in vitro*, pero es necesario comprobar si esta disminución es también significativa en pacientes tratados con un CART-BCMA o por lo contrario si el sBCMA solo afecta en los primeros tiempos de activación de la célula CART. Actualmente, ya hay un ensayo clínico analizando la combinación de estos inhibidores con células CART-BCMA (NCT03502577).

El CRS y la neurotoxicidad son eventos comunes tras la administración de la terapia CART<sup>183,123,102,192,133</sup>. Normalmente, suelen ser gestionadas con éxito, tratando los síntomas de los pacientes siguiendo las guías internacionales<sup>99,194</sup> (Tabla 3 de la introducción) y en caso de un aumento considerable de la IL-6 usando tocilizumab. Igualmente, en el diseño de los distintos CARTs siempre se busca el constructo que pueda provocar un menor CRS. Nuestros resultados demuestran que las células ARI2h producen una menor cantidad de TNF- $\alpha$  que las células ARI2m. Si bien es cierto que la IL-6 es la citoquina que incrementa exponencialmente durante el desarrollo del CRS<sup>182,195</sup>, otras citoquinas como el TNF- $\alpha$  o el IL1- $\beta$  son producidas antes y son las principales iniciadoras de este síndrome<sup>196,181</sup>. Cuando las células CART empiezan a

activarse y producir IFN- $\gamma$ , los macrófagos también se activan siendo los máximos productores de citoquinas durante el CRS<sup>182</sup>. En nuestro modelo *in vitro* con macrófagos tratamos de aproximarnos más al modelo *in vivo*. En este modelo con macrófagos las células ARI2h producen menos cantidad de TNF- $\alpha$ , hecho significativo ya que el CRS en pacientes de MM tratados con un CARTBCMA está asociado con un mayor pico de TNF- $\alpha$ <sup>123</sup>. Además, los CARTs con una mayor cinética están asociados con un mayor CRS<sup>197</sup>, sugiriendo que la menor cinética de las células ARI2h en comparación con las células ARI2m podría explicar la menor toxicidad observada en el modelo *in vivo* de enfermedad avanzada.

## 2º Estudio

Cada vez hay más estudios en cuanto a distintos tipos de CAR-NK, tanto en lo referido a tipo de fuente de NK escogida como en método de infección. Por ahora, la línea celular NK92<sup>161,164</sup> es la fuente de NK mayoritariamente escogida por tener una expansión e infección más fácil que las NK primarias. Las NK por su naturaleza de lucha contra las distintas infecciones bacterianas y víricas presentan una alta resistencia a ser infectadas<sup>198,199</sup>. Por ello, varios estudios se han ido sucediendo en el tiempo mostrando distintos métodos de infección. Los métodos de infección más usados y que mejores resultados han dado son las infecciones retrovirales<sup>157</sup> y lentivirales<sup>200</sup>. La mayor diferencia entre ambas infecciones es que las retrovirales tienen la limitación de infectar solo las células en fase de división. Por el contrario, las infecciones lentivirales si tienen la capacidad de infectar células en no división. Sin embargo, ambos métodos se caracterizan por su variabilidad de infección variando desde un 2% al 80% de células infectadas, con protocolos que incluyen altas dosis de virus, varias rondas de infección y muchas veces en detrimento de la viabilidad celular<sup>199</sup>. También hay estudios usando métodos no virales<sup>201,202</sup> como la electroporación basada en la introducción de RNA en el interior de la célula mediante un impulso eléctrico que desestabiliza la membrana celular. Este método suele dar mejores infecciones a corto plazo, es independiente de la división celular y en principio se obtiene una menor mortalidad, pero suelen ser infecciones transitorias<sup>199</sup>.

Nuestros resultados con un CAR-NK demuestran que, a pesar de las dificultades de infección y expansión comparadas con una línea tumoral como la NK92, es viable conseguir un CAR-NK con células de CB-NK mediante una infección lentiviral. La diferencia entre este método y otros usados anteriormente se basa en el receptor escogido para permitir la entrada del virus en las células NK<sup>189</sup>. El vector BaEV-LV (*Baboon envelope pseudotyped lentiviral vector*) se une al receptor ASCT1 y ASCT2 presente en las células NK activadas para permitir la entrada del virus en las células,

mientras que la mayoría de las infecciones lentivirales usan el vector VSV-G (*Vesicular Stomatitis Virus type-G*) el receptor del cual, LDL-R, apenas está presente en las células NK<sup>190</sup>. En nuestro estudio usamos CB-NK expandidas *in vitro* las cuales tienen alrededor de un 83,4 % de infección con el vector BaEV, pero este vector también permite infectar células NK primarias sin expansión previa sobre un 23 %<sup>189</sup>. Aunque en un estudio anterior al nuestro, demuestran que preferentemente son las células NK activadas y que están proliferando las más susceptibles a ser infectadas<sup>190</sup>.

Sin embargo, los mismos estudios parecen concluir que la población de células NK más susceptibles a ser infectadas no es la que presenta una mayor actividad citotóxica. Porque las células NK CX3CR1 negativas concuerdan con ser la población y CD56<sup>hi</sup> y más proliferativa, mientras que las células NK CX3CR1 positivas son la población CD56<sup>dim</sup>, CD16+ y suelen presentar una mayor actividad citotóxica<sup>190,203</sup>. La citoquina IL-15 regula negativamente la expresión de CX3CR1<sup>204</sup>, hecho que explicaría porque tras la expansión de IL-2 e IL-15 son más susceptibles a ser infectadas.

Los resultados *in vitro* de nuestro estudio demuestran que un CAR-NK de células de cordón umbilical es factible y que ejerce una mayor citotoxicidad que las CB-NK *per se*, aunque el efecto citotóxico de las CAR-NK es limitado en el tiempo y según la dosis. Esta actividad se ve aumentada cuando se añade exógenamente IL-2. Nuestros resultados junto con los resultados obtenidos de otros estudios ya publicados parecen demostrar la necesidad de citoquinas como la IL-2 o la IL-15 en las CAR-NK para que perduren en el tiempo y tengan una mayor actividad citotóxica<sup>199</sup>. Por ello, los últimos estudios publicados de CAR-NK incluyen en el constructo del CAR la secreción local de IL-15<sup>205</sup> para aumentar su supervivencia y proliferación *in vivo*.

Sin embargo, los resultados *in vivo* obtenidos no concuerdan con los resultados *in vitro*, ya que la adición de IL-2 cada 2-3 días no mejora la actividad citolítica del CAR frente al tumor desarrollado en el ratón. Cabe destacar que la *n* usada en el experimento *in vivo*, es una muestra pequeña y debería ser superior para poder obtener unos resultados más concluyentes. Sin embargo, los resultados parecen mostrar que la adición de IL-2 apenas ejerce una mejora en la actividad del CAR-NK *in vivo*. Este hecho puede deberse al efecto pro-inflamatorio de la IL-2<sup>206</sup>. La IL-2 favorece la proliferación del fenotipo CD56<sup>bright</sup> esto podría suponer, que la expansión de células NK en el ratón no es de un fenotipo altamente citotóxico y por tanto su actividad *in vivo* es menor que la obtenida *in vitro*, donde la dosis dada es suficiente para acabar con las células tumorales mientras que en el ratón es necesaria una mayor proliferación.

Por último, la posibilidad de unir ambas terapias CAR-T+CAR-NK parece prometedora tras los resultados del experimento *in vivo*, dónde la suma del CAR-T a mitad de dosis junto al CAR-NK a mitad de dosis ejerce la misma actividad citolítica que la misma dosis solo de CAR-T. Esta unión creemos que puede incrementar la actividad citotóxica de las CAR-NK al ejercer los linfocitos CART como fuente de citoquinas como la IL-2 que requieren las CAR-NK, llevando por tanto, a una colaboración en su actividad citotóxica.

## Discusión final

Durante el transcurso de esta tesis se han desarrollado dos tipos distintos de CARs, un CAR-T BCMA para el tratamiento de pacientes con MM y un CAR-NK CD19 para el tratamiento de pacientes con linfoma de Burkitt. Ambos CARs han demostrado una alta actividad citotóxica *in vitro*, siendo el CAR-T BCMA el que ha mostrado una mayor actividad tanto *in vitro* como *in vivo* frente a su enfermedad diana, ya que los resultados demuestran que puede eliminar incluso una alta carga tumoral ya establecida en el modelo *in vivo*. Cabe destacar, que son enfermedades distintas y si bien el MM es una enfermedad que sigue siendo definida como incurable, el índice de proliferación de las células del linfoma de Burkitt está establecido como una de los más altos. Por tanto, no se pueden comparar ambos CARs en paralelo.

Los distintos estudios publicados demuestran que la terapia CAR está más desarrollada y ha dado mejores resultados con linfocitos T que con células NK<sup>183,207,208</sup>. Sin embargo, ambas poblaciones celulares presentan unas características propias muy interesantes para la clínica. Los linfocitos T son fáciles de manejar, infectar y expandir. Tras la infusión en pacientes tiene una larga persistencia confiriendo una protección a largo plazo, evitando posibles rebrotes de la enfermedad, pero que pueden conllevar a una toxicidad en determinados casos como es en los CART19 donde los pacientes tienen que ser tratados con reemplazo intravenoso de Igs. Por otro lado, las NK no tienen una alta persistencia en pacientes, siendo de pocos días a semanas la media y necesitando en muchos casos estimulación mediante citoquinas. Sin embargo, este hecho confiere que el tratamiento sea más seguro y sin necesidad de ser eliminado mediante genes suicidas. El principal atractivo de las NK es que no provocan EICH, por tanto, permiten el uso de células no autólogas facilitando disponer de un producto ya preparado, mientras que el uso de linfocitos T para la terapia CAR implica una espera de mínimo 2-3 semanas para disponer el producto listo para el paciente<sup>205</sup>. Además, varios estudios coinciden en el beneficioso uso de células NK alogénicas en vez de usar las propias células del paciente<sup>154</sup>, ya que las NK alogénicas tienen la capacidad de ejercer una respuesta anti-tumoral y por tanto la citotoxicidad ejercida por células

CAR-NK de donantes sería mayor que la obtenida por las propias CAR-NK del paciente<sup>205</sup>. Se cree que hay varios mecanismos implicados en este hecho, pero sobre todo, basado en la diferencia entre el HLA de los KIRs de las células NK del donante y el HLA del paciente<sup>207</sup>. Finalmente, por el momento las NK no han mostrado la toxicidad relacionada con la terapia CAR-T como es el CRS y la neurotoxicidad<sup>207,208</sup>.



# Conclusiones



1. El CAR-T BCMA tanto su versión murina como su versión humanizada ha mostrado una alta eficacia in vitro e in vivo frente a MM. Estos resultados han facilitado poder diseñar un ensayo clínico para pacientes de MM multicéntrico en el estado español usando la versión humanizada del CAR-T BCMA realizado durante esta tesis.
2. El BCMA soluble afecta la actividad del CAR-T BCMA en el mieloma múltiple. Son necesarios más estudios clínicos para comprobar si la actividad del CAR-T BCMA en pacientes también es parcialmente inhibida por el BCMA soluble.
3. La actividad del CAR-NK para LNH es inferior a la observada con CAR-T para la misma enfermedad. La combinación de CAR-NK con células CAR-T o con la adición de IL-2 pueden mejorar la actividad anti-tumoral y seguir ofreciendo una serie de características que confieren a las CB-NK ser una población inmune muy prometedora.



## Bibliografía

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
2. Cancer. Available at: <https://www-who-int.sire.ub.edu/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. (Accessed: 20th February 2020)
3. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer* **103**, 356–387 (2018).
4. Artz, A. S. & Ershler, W. B. Management of the older patient. in *Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Clinical Practice* 303–312 (Elsevier Ltd, 2009). doi:10.1016/B978-0-443-10147-2.50034-5
5. *Hematología clínica / [dirigido por:] J. Sans-Sabrafen, C. Besses Raebel, J. L. Vives Corrons.* (Elsevier, 2006).
6. Lenz, G. & Staudt, L. M. Aggressive lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1417–1429 (2010).
7. Rodak, B. F., Giovaniello, O., Oxemberg, J., Rondionone, S. & Taveira, J. *Hematología : fundamentos y aplicaciones clínicas.* (Médica panamericana, 2005).
8. Kumar, S. K. *et al.* Multiple myeloma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 1–20 (2017).
9. Hoffman, R. *Hematology : basic principles and practice.* (Churchill Livingstone, 2005).
10. Iftikhar, A. *et al.* Investigational Monoclonal Antibodies in the Treatment of Multiple Myeloma: A Systematic Review of Agents under Clinical Development. *Antibodies* **8**, 34 (2019).
11. Sanz Alonso, M. A. & Carreras i Pons, E. *Manual práctico de hematología clínica.* (Antares, 2005).
12. Smadja, N. V. *et al.* Chromosomal analysis in multiple myeloma: Cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia* **12**, 960–969 (1998).
13. van Nieuwenhuijzen, N., Spaan, I., Raymakers, R. & Peperzak, V. From MGUS to multiple myeloma, a paradigm for clonal evolution of premalignant cells. *Cancer Research* **78**, 2449–2456 (2018).
14. Mitsiades, C. S., Mitsiades, N., Munshi, N. C. & Anderson, K. C. Focus on multiple myeloma. *Cancer Cell* **6**, 439–444 (2004).

15. Kaufman, J. L. Roundtable: How I treat a newly diagnosed patient with high-risk myeloma. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* **2019**, 120–124 (2019).
16. Fowler, J. A., Edwards, C. M. & Croucher, P. I. Tumor-host cell interactions in the bone disease of myeloma. *Bone* **48**, 121–128 (2011).
17. Kawano, Y. *et al.* Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunol. Rev.* **263**, 160–172 (2015).
18. Giannopoulos, K., Kaminska, W., Hus, I. & Dmoszynska, A. The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: Detailed characterisation of immune status in multiple myeloma. *Br. J. Cancer* **106**, 546–552 (2012).
19. Galustian, C. *et al.* The anti-cancer agents lenalidomide and pomalidomide inhibit the proliferation and function of T regulatory cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**, 1033–1045 (2009).
20. Kyle, R. A. *et al.* Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N. Engl. J. Med.* **378**, 241–249 (2018).
21. Kyle, R. A. *et al.* Clinical Course and Prognosis of Smoldering (Asymptomatic) Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **356**, 2582–2590 (2007).
22. Piechotta, V. *et al.* Multiple drug combinations of bortezomib, lenalidomide, and thalidomide for first-line treatment in adults with transplant-ineligible multiple myeloma: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2019). doi:10.1002/14651858.CD013487
23. Raab, M. S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P. G. & Anderson, K. C. Seminar Multiple myeloma. *Lancet* **374**, 324–339 (2009).
24. Epstein, B. S. Where we were, where we are, where we are going. *Anesth. Analg.* **113**, 480–483 (2011).
25. Bergsagel, P. L. Where We Were, Where We Are, Where We Are Going: Progress in Multiple Myeloma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* **34**, 199–203 (2014).
26. Palumbo, A. & Anderson, K. Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1046–1060 (2011).
27. Mikhael, J. Treatment Options for Triple-Class Refractory Multiple Myeloma. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* (2019). doi:10.1016/j.clml.2019.09.621
28. Krishnan, A. *et al.* Autologous haemopoietic stem-cell transplantation followed by allogeneic or autologous haemopoietic stem-cell transplantation in patients

- with multiple myeloma (BMT CTN 0102): A phase 3 biological assignment trial. *Lancet Oncol.* **12**, 1195–1203 (2011).
29. Castella, M., de Larrea, C. F. & Martín-Antonio, B. Immunotherapy: A novel era of promising treatments for multiple myeloma. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, (2018).
  30. Armitage, J. O., Gascoyne, R. D., Lunning, M. A. & Cavalli, F. Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet* **390**, 298–310 (2017).
  31. Ferlay, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* **144**, 1941–1953 (2019).
  32. Jiang, M., Bennani, N. N. & Feldman, A. L. Lymphoma classification update: B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Expert Review of Hematology* **10**, 405–415 (2017).
  33. Galaznik, A. *et al.* Systematic review of therapy used in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma. *Future Science OA* **4**, (2018).
  34. Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375–2390 (2016).
  35. Kalisz, K. *et al.* An update on Burkitt lymphoma: a review of pathogenesis and multimodality imaging assessment of disease presentation, treatment response, and recurrence. *Insights into Imaging* **10**, (2019).
  36. Dunleavy, K. Approach to the Diagnosis and Treatment of Adult Burkitt's Lymphoma. *J. Oncol. Pract.* **14**, 665–671 (2018).
  37. Schmitz, N., Stelljes, M. & Bazarbachi, A. Diffuse large b-cell lymphoma. in *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* 633–641 (Springer International Publishing, 2018). doi:10.1007/978-3-030-02278-5\_85
  38. Young, R. M., Shaffer, A. L., Phelan, J. D. & Staudt, L. M. B-Cell Receptor Signaling in Diffuse Large B-Cell lymphoma. *Seminars in Hematology* **52**, 77–85 (2015).
  39. Schmitz, N., Stelljes, M. & Bazarbachi, A. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. in *The EBMT Handbook* 633–641 (Springer International Publishing, 2019). doi:10.1007/978-3-030-02278-5\_85
  40. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Informe de Posicionamiento Terapéutico de tisagenlecleucel (Kymriah®) en el tratamiento de pacientes pediátricos y adultos hasta 25 años con leucemia linfoblástica

- aguda de células B refractaria, en recaída post-trasplante, o en segunda recaída o posterior. *10* (2019).
41. Stepniak, A. *et al.* Primary ovarian Burkitt's lymphoma: a rare oncological problem in gynaecology: a review of literature. *Archives of Gynecology and Obstetrics* **296**, 653–660 (2017).
  42. Corazzelli, G. *et al.* RD-CODOX-M/IVAC with rituximab and intrathecal liposomal cytarabine in adult Burkitt lymphoma and 'unclassifiable' highly aggressive B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **156**, 234–244 (2012).
  43. *Inmunología [de] Roitt : fundamentos : 12a edición/ Peter J. Delves ... [et al.]*. (Editorial Médica Panamericana, 2014).
  44. Gaudino, S. J. & Kumar, P. Cross-talk between antigen presenting cells and T cells impacts intestinal homeostasis, bacterial infections, and tumorigenesis. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
  45. Dobosz, P. & Dzieciatkowski, T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
  46. COLEY, W. B. CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF SARCOMA. *Ann. Surg.* **14**, 199–220 (1891).
  47. Immunotherapy for Cancer - National Cancer Institute.
  48. Strohl & Naso. Bispecific T-Cell Redirection versus Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cells as Approaches to Kill Cancer Cells. *Antibodies* **8**, 41 (2019).
  49. Oiseth, S. J. & Aziz, M. S. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *J. Cancer Metastasis Treat.* **3**, 250 (2017).
  50. Christofi, T., Baritaki, S., Falzone, L., Libra, M. & Zaravinos, A. Current Perspectives in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. **11**, 1472 (2019).
  51. Kantoff, P. W. *et al.* Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 411–422 (2010).
  52. Anassi, E. & Ndefo, U. A. Sipuleucel-T (Provenge) injection the first immunotherapy agent (Vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. *P T* **36**, 197–202 (2011).
  53. Pearl, T. M., Markert, J. M., Cassady, K. A. & Ghonime, M. G. Oncolytic Virus-Based Cytokine Expression to Improve Immune Activity in Brain and Solid Tumors. *Molecular Therapy - Oncolytics* **13**, 14–21 (2019).
  54. Gonzalez-Rodriguez, A. P., Villa-Álvarez, M., Sordo-Bahamonde, C., Lorenzo-Herrero, S. & Gonzalez, S. NK Cells in the Treatment of Hematological

- Malignancies. *J. Clin. Med.* **8**, 1557 (2019).
55. Sanchez, L., Wang, Y., Siegel, D. S. & Wang, M. L. Daratumumab: A first-in-class CD38 monoclonal antibody for the treatment of multiple myeloma. *Journal of Hematology and Oncology* **9**, (2016).
  56. Tay, S. S., Carol, H. & Biro, M. TriKEs and BiKEs join CARs on the cancer immunotherapy highway. *Hum. Vaccin. Immunother.* **12**, 2790–2796 (2016).
  57. Kalos, M. *et al.* T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci. Transl. Med.* **3**, (2011).
  58. Kwon, E. D. *et al.* Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8099–103 (1997).
  59. Freeman, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **192**, 1027–34 (2000).
  60. Garon, E. B. *et al.* Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2018–2028 (2015).
  61. Reck, M. Pembrolizumab as first-line therapy for metastatic non-small-cell lung cancer. *Immunotherapy* **10**, 93–105 (2018).
  62. Motzer, R. J. *et al.* Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1277–1290 (2018).
  63. Zhang, M. *et al.* Monitoring checkpoint inhibitors: predictive biomarkers in immunotherapy. *Front. Med.* **13**, 32–44 (2019).
  64. Larkin, J. *et al.* Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **373**, 23–34 (2015).
  65. Poch, M. *et al.* Expansion of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) from bladder cancer. *Oncoimmunology* **7**, (2018).
  66. Rosenberg, S. A. *et al.* Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **319**, 1676–1680 (1988).
  67. Gros, A. *et al.* Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. *Nat. Med.* **22**, 433–438 (2016).
  68. Tokito, T. *et al.* Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8+ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent

- chemoradiotherapy. *Eur. J. Cancer* **55**, 7–14 (2016).
69. Chang, Z. N. L. & Chen, Y. Y. CARs: Synthetic Immunoreceptors for Cancer Therapy and Beyond. *Trends in Molecular Medicine* **23**, 430–450 (2017).
  70. Mehta, R. S. & Rezvani, K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front. Immunol.* **9**, 283 (2018).
  71. Shah, N. *et al.* Phase I study of cord blood-derived natural killer cells combined with autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **177**, 457–466 (2017).
  72. Dai, H., Wang, Y., Lu, X. & Han, W. Chimeric antigen receptors modified T-cells for cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute* **108**, (2016).
  73. Gross, G., Waks, T. & Eshhar, Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 10024–10028 (1989).
  74. Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G. & Schindler, D. G. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the  $\gamma$  or  $\zeta$  subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 720–724 (1993).
  75. Hwu, P. *et al.* In Vivo Antitumor Activity of T Cells Redirected with Chimeric Antibody/T-Cell Receptor Genes. *Cancer Res.* **55**, 3369–3373 (1995).
  76. Kershaw, M. H. *et al.* A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6106–6115 (2006).
  77. Smith, E. L. *et al.* Development and Evaluation of an Optimal Human Single-Chain Variable Fragment-Derived BCMA-Targeted CAR T Cell Vector. *Mol. Ther.* **26**, 1447–1456 (2018).
  78. Dotti, G., Gottschalk, S., Savoldo, B. & Brenner, M. K. Design and Development of Therapies using Chimeric Antigen Receptor-Expressing T cells. doi:10.1111/imr.12131
  79. Chen, X., Zaro, J. & Shen, W.-C. Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. (2012). doi:10.1016/j.addr.2012.09.039
  80. Savoldo, B. *et al.* CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor–modified T cells in lymphoma patients. *J. Clin. Invest.* **121**, 1822–1826 (2011).
  81. Feucht, J. *et al.* Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency. *Nature Medicine* **25**, 82–88 (2019).

82. Pulè, M. A. *et al.* A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol. Ther.* **12**, 933–941 (2005).
83. Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A. & June, C. H. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **365**, 725–733 (2011).
84. Zhao, Z. *et al.* Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell* **28**, 415–428 (2015).
85. Long, A. H. *et al.* 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat. Med.* **21**, 581–590 (2015).
86. Yeku, O. O. & Brentjens, R. J. Armored CAR T-cells: Utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochemical Society Transactions* **44**, 412–418 (2016).
87. Kim, D. W. & Cho, J. Y. Recent advances in allogeneic CAR-T cells. *Biomolecules* **10**, (2020).
88. Suarez, E. R. *et al.* Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model. *Oncotarget* **7**, 34341–34355 (2016).
89. Eyquem, J. *et al.* Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* **543**, 113–117 (2017).
90. Macleod, D. T. *et al.* Integration of a CD19 CAR into the TCR Alpha Chain Locus Streamlines Production of Allogeneic Gene-Edited CAR T Cells. *Mol. Ther.* **25**, 949–961 (2017).
91. Qasim, W. *et al.* Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
92. Shah, N. N., Maatman, T., Hari, P. & Johnson, B. Multi Targeted CAR-T Cell Therapies for B-Cell Malignancies. *Front. Oncol.* **9**, (2019).
93. Lanitis, E., Coukos, G. & Irving, M. All systems go: converging synthetic biology and combinatorial treatment for CAR-T cell therapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **65**, 75–87 (2020).
94. Grupp, S. A. *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1509–1518 (2013).
95. Maude, S. L. *et al.* Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in

- leukemia. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1507–1517 (2014).
96. Morgan, R. A. *et al.* Case report of a serious adverse event following the administration of t cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol. Ther.* **18**, 843–851 (2010).
  97. Sadelain, M., Brentjens, R. & Rivière, I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discovery* **3**, 388–398 (2013).
  98. Perez-Amill, L., Marzal, B., Urbano-Ispizua, A., Juan, M. & Martín-Antonio, B. CAR-T cell therapy: A door is open to find innumerable possibilities of treatments for cancer patients. *Turkish Journal of Hematology* **35**, 217–228 (2018).
  99. Porter, D., Frey, N., Wood, P. A., Weng, Y. & Grupp, S. A. Grading of cytokine release syndrome associated with the CAR T cell therapy tisagenlecleucel. *Journal of Hematology and Oncology* **11**, (2018).
  100. Lee, D. W. *et al.* Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* **124**, 188–195 (2014).
  101. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Informe de Posicionamiento Terapéutico de axicabtagén ciloleucel (Yescarta®) en el tratamiento de pacientes adultos con linfoma difuso de células grandes B o primario mediastínico de células grandes B, en recaída o refractario tras dos o más líneas de tra. 7 (2019).
  102. Zhao, W. H. *et al.* A phase 1, open-label study of LCAR-B38M, a chimeric antigen receptor T cell therapy directed against B cell maturation antigen, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *J. Hematol. Oncol.* **11**, (2018).
  103. Brudno, J. N. *et al.* T cells genetically modified to express an anti-B-Cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of poor-prognosis relapsed multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* **36**, 2267–2280 (2018).
  104. Brown, C. E. *et al.* Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2561–2569 (2016).
  105. Ahmed, N. *et al.* HER2-specific chimeric antigen receptor–modified virus-specific T cells for progressive glioblastoma: A phase 1 dose-escalation trial. *JAMA Oncol.* **3**, 1094–1101 (2017).
  106. Davila, M. L., Brentjens, R., Wang, X., Rivière, I. & Sadelain, M. How do cars work? Early insights from recent clinical studies targeting CD19. *Oncolimmunology* **1**, 1577–1583 (2012).

107. Brentjens, R. J. *et al.* Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* **118**, 4817–4828 (2011).
108. Locke, F. L. *et al.* Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1–2 trial. *Lancet Oncol.* **20**, 31–42 (2019).
109. Kochenderfer, J. N. *et al.* B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* **119**, 2709–2720 (2012).
110. Referencia, S. D. E. *Informe de Posicionamiento Terapéutico de axicabtagén ciloleucel (Yescarta®) en el tratamiento de pacientes adultos con linfoma difuso de células grandes B o primario mediastínico de células grandes B, en recaída o refractario tras dos o más líneas de tra.* (2019).
111. FDA approval brings first gene therapy to the United States | FDA. Available at: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approval-brings-first-gene-therapy-united-states>. (Accessed: 20th January 2020)
112. Tai, Y. T. & Anderson, K. C. Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma. *Immunotherapy* **7**, 1187–1199 (2015).
113. Tai, Y. T. *et al.* APRIL and BCMA promote human multiple myeloma growth and immunosuppression in the bone marrow microenvironment. *Blood* **127**, 3225–3236 (2016).
114. Shah, N., Chari, A., Scott, E., Mezzi, K. & Usmani, S. Z. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia* **34**, 985–1005 (2020).
115. Carpenter, R. O. *et al.* B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* **19**, 2048–2060 (2013).
116. Ali, S. A. *et al.* T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood* **128**, 1688–1700 (2016).
117. Berdeja, J. G. *et al.* Durable Clinical Responses in Heavily Pretreated Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Updated Results from a Multicenter Study of bb2121 Anti-Bcma CAR T Cell Therapy. *Blood* **130**, 740–740 (2017).
118. Perez-Amill, L. *et al.* Preclinical development of a humanized chimeric antigen receptor against B cell maturation antigen for multiple myeloma.

- Haematologica* haematol.2019.228577 (2020).  
doi:10.3324/haematol.2019.228577
119. Bluhm, J. *et al.* CAR T Cells with Enhanced Sensitivity to B Cell Maturation Antigen for the Targeting of B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma and Multiple Myeloma. *Mol. Ther.* **26**, 1906–1920 (2018).
  120. Lam, N. *et al.* Anti-BCMA chimeric antigen receptors with fully human heavy-chain-only antigen recognition domains. *Nat. Commun.* **11**, 283 (2020).
  121. Madduri, D. *et al.* Results from CARTITUDE-1: A Phase 1b/2 Study of JNJ-4528, a CAR-T Cell Therapy Directed Against B-Cell Maturation Antigen (BCMA), in Patients with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma (R/R MM). *Blood* **134**, 577–577 (2019).
  122. Zhao, W.-H. *et al.* A phase 1, open-label study of LCAR-B38M, a chimeric antigen receptor T cell therapy directed against B cell maturation antigen, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *J. Hematol. Oncol.* **11**, 141 (2018).
  123. Raje, N. *et al.* Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **380**, 1726–1737 (2019).
  124. Berdeja, J. G. *et al.* Updated Results from an Ongoing Phase 1 Clinical Study of bb21217 Anti-Bcma CAR T Cell Therapy. *Blood* **134**, 927 (2019).
  125. Shah, U. A. & Mailankody, S. CAR T and CAR NK cells in multiple myeloma: Expanding the targets. *Best Practice and Research: Clinical Haematology* **33**, 101141 (2020).
  126. Yan, L. *et al.* Sequential CD19- and Bcma-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cell Treatment for RRMM: Report from a Single Center Study. *Blood* **134**, 578–578 (2019).
  127. Cohen, A. D. *et al.* Safety and Efficacy of B-Cell Maturation Antigen (BCMA)-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells (CART-BCMA) with Cyclophosphamide Conditioning for Refractory Multiple Myeloma (MM). *Blood* **130**, 505–505 (2017).
  128. Lee, L. *et al.* An APRIL-based chimeric antigen receptor for dual targeting of BCMA and TACI in multiple myeloma. *Blood* **131**, 746–758 (2018).
  129. Guo, B. *et al.* CD138-directed adoptive immunotherapy of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells for multiple myeloma. *J. Cell. Immunother.* **2**, 28–35 (2016).
  130. Wang, X. *et al.* Lenalidomide enhances the function of CS1 chimeric antigen

- receptor-redirected T cells against multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* **24**, 106–119 (2018).
131. Hosen, N. *et al.* The activated conformation of integrin  $\beta 7$  is a novel multiple myeloma-specific target for CAR T cell therapy. *Nat. Med.* **23**, 1436–1443 (2017).
  132. Smith, E. L. *et al.* GPRC5D is a target for the immunotherapy of multiple myeloma with rationally designed CAR T cells. *Sci. Transl. Med.* **11**, (2019).
  133. Schuster, S. J. *et al.* Chimeric antigen receptor T Cells in refractory B-Cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2545–2554 (2017).
  134. Turtle, C. J. *et al.* Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci. Transl. Med.* **8**, (2016).
  135. Lee, S. Y. *et al.* Preclinical Optimization of a CD20-specific Chimeric Antigen Receptor Vector and Culture Conditions. *J. Immunother.* **41**, 19–31 (2018).
  136. Zhang, W. Y. *et al.* Treatment of cd20-directed chimeric antigen receptor-modified t cells in patients with relapsed or refractory b-cell non-hodgkin lymphoma: An early phase iia trial report. *Signal Transduct. Target. Ther.* **1**, 1–9 (2016).
  137. Haso, W. *et al.* Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **121**, 1165–1171 (2013).
  138. Ramos, C. A. *et al.* Clinical responses with T lymphocytes targeting malignancy-associated  $\kappa$  light chains. *J. Clin. Invest.* **126**, 2588–2596 (2016).
  139. Ramos, C. A. *et al.* Clinical and immunological responses after CD30-specific chimeric antigen receptor-redirected lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **127**, 3462–3471 (2017).
  140. Scarfò, I. *et al.* Anti-CD37 chimeric antigen receptor T cells are active against B- and T-cell lymphomas. *Blood* **132**, 1495–1506 (2018).
  141. Friedman, K. M. *et al.* Effective Targeting of Multiple B-Cell Maturation Antigen-Expressing Hematological Malignancies by Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Hum. Gene Ther.* **29**, 585–601 (2018).
  142. Domogala, A., Madrigal, J. A. & Saudemont, A. Natural Killer Cell Immunotherapy: From Bench to Bedside. *Front. Immunol.* **6**, 264 (2015).
  143. Farag, S. S. & Caligiuri, M. A. Human natural killer cell development and

- biology. *Blood Rev.* **20**, 123–137 (2006).
144. Habib, S., Tariq, S. M. & Tariq, M. Chimeric Antigen Receptor-Natural Killer Cells: The Future of Cancer Immunotherapy. *Ochsner J.* **19**, 186 (2019).
  145. Glienke, W. *et al.* Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells. *Front. Pharmacol.* **6**, 21 (2015).
  146. Moretta, L. *et al.* Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **117**, 764–71 (2011).
  147. Frazao, A. *et al.* NKG2D/NKG2-Ligand pathway offers new opportunities in cancer treatment. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
  148. Martin-Antonio, B. *et al.* Transmissible cytotoxicity of multiple myeloma cells by cord blood-derived NK cells is mediated by vesicle trafficking. *Cell Death Differ.* **22**, 96–107 (2015).
  149. Campbell, K. S. & Purdy, A. K. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: Lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology* **132**, 315–325 (2011).
  150. Horton, N. C. & Mathew, P. A. NKp44 and natural cytotoxicity receptors as damage-associated molecular pattern recognition receptors. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
  151. Barrow, A. D., Martin, C. J. & Colonna, M. The natural cytotoxicity receptors in health and disease. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
  152. Zhang, J., Zheng, H. & Diao, Y. Natural Killer Cells and Current Applications of Chimeric Antigen Receptor-Modified NK-92 Cells in Tumor Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
  153. Gonzalez-Rodriguez, Villa-Álvarez, Sordo-Bahamonde, Lorenzo-Herrero & Gonzalez. NK Cells in the Treatment of Hematological Malignancies. *J. Clin. Med.* **8**, 1557 (2019).
  154. Ruggeri, L. *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **295**, 2097–100 (2002).
  155. Lanier, L. L. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 259–268 (2008).
  156. Kloess, S., Kretschmer, A., Stahl, L., Fricke, S. & Koehl, U. CAR-Expressing Natural Killer Cells for Cancer Retargeting. *Transfus. Med. Hemother.* **46**, 4–13 (2019).

157. Chang, Y.-H. *et al.* A Chimeric Receptor with NKG2D Specificity Enhances Natural Killer Cell Activation and Killing of Tumor Cells. *Cancer Res.* **73**, 1777–1786 (2013).
158. Liu, D. *et al.* Chimeric antigen receptor (CAR)-modified natural killer cell-based immunotherapy and immunological synapse formation in cancer and HIV. *Protein Cell* **8**, 861–877 (2017).
159. Liu, B. *et al.* Development of c-MET-specific chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells with cytotoxic effects on human liver cancer HepG2 cells. *Mol. Med. Rep.* **20**, 2823–2831 (2019).
160. Klingemann, H. Are natural killer cells superior CAR drivers? *Oncoimmunology* **3**, e28147 (2014).
161. Boissel, L. *et al.* Retargeting NK-92 cells by means of CD19- and CD20-specific chimeric antigen receptors compares favorably with antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Oncoimmunology* **2**, e26527 (2013).
162. Esser, R. *et al.* NK cells engineered to express a GD2-specific antigen receptor display built-in ADCC-like activity against tumour cells of neuroectodermal origin. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 569 (2012).
163. Chen, K. H. *et al.* Preclinical targeting of aggressive T-cell malignancies using anti-CD5 chimeric antigen receptor. *Leukemia* **31**, 2151–2160 (2017).
164. Zhang, C. *et al.* ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **108**, (2016).
165. Han, J. *et al.* CAR-Engineered NK Cells Targeting Wild-Type EGFR and EGFRvIII Enhance Killing of Glioblastoma and Patient-Derived Glioblastoma Stem Cells. *Sci. Rep.* **5**, 11483 (2015).
166. Schönfeld, K. *et al.* Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor. *Mol. Ther.* **23**, 330–8 (2015).
167. Chu, J. *et al.* CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma. *Leukemia* **28**, 917–27 (2014).
168. Jiang, H. *et al.* Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells. *Mol. Oncol.* **8**, 297–310 (2014).
169. Töpfer, K. *et al.* DAP12-Based Activating Chimeric Antigen Receptor for NK Cell Tumor Immunotherapy. *J. Immunol.* **194**, 3201–3212 (2015).

170. Liu, E. *et al.* Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia* **32**, 520–531 (2018).
171. Murakami, T. *et al.* Novel Human NK Cell Line Carrying CAR Targeting EGFRvIII Induces Antitumor Effects in Glioblastoma Cells. *Anticancer Res.* **38**, 5049–5056 (2018).
172. Ao, X. *et al.* Anti- $\alpha$ FR CAR-engineered NK-92 Cells Display Potent Cytotoxicity Against  $\alpha$ FR-positive Ovarian Cancer. *J. Immunother.* **42**, 284–296 (2019).
173. Structure-based rational design of a novel chimeric PD1-NKG2D receptor for natural killer cells. *Mol. Immunol.* **114**, 108–113 (2019).
174. Li, Y., Hermanson, D. L., Moriarity, B. S. & Kaufman, D. S. Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Antitumor Activity. *Cell Stem Cell* **23**, 181-192.e5 (2018).
175. Xu, Y. *et al.* 2B4 costimulatory domain enhancing cytotoxic ability of anti-CD5 chimeric antigen receptor engineered natural killer cells against T cell malignancies. *J. Hematol. Oncol.* **12**, 49 (2019).
176. Xu, X. *et al.* NKT cells co-expressing a GD2-specific chimeric antigen receptor and IL-15 show enhanced in vivo persistence and antitumor activity against neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* clincanres.0421.2019 (2019). doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0421
177. Cancer Immunotherapy: Make Way for CAR NK. *Cancer Discov.* (2020). doi:10.1158/2159-8290.CD-ND2020-004
178. Tang, X. *et al.* First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Am. J. Cancer Res.* **8**, 1083–1089 (2018).
179. Liu, E. *et al.* Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N. Engl. J. Med.* **382**, 545–553 (2020).
180. Oden, F. *et al.* Potent anti-tumor response by targeting B cell maturation antigen (BCMA) in a mouse model of multiple myeloma. *Mol. Oncol.* **9**, 1348–1358 (2015).
181. Norelli, M. *et al.* Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat. Med.* **24**, 739–748 (2018).
182. Giavridis, T. *et al.* CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade letter. *Nat. Med.* **24**, 731–738

- (2018).
183. Maude, S. L. *et al.* Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **378**, 439–448 (2018).
  184. Laurent, S. A. *et al.*  $\gamma$ -secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
  185. Castella, M. *et al.* Development of a Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor: A Paradigm for an Affordable CAR T Cell Production at Academic Institutions. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **12**, 134–144 (2019).
  186. Radhakrishnan, S. V. *et al.* CD229 CAR T cells eliminate multiple myeloma and tumor propagating cells without fratricide. *Nat. Commun.* **11**, 798 (2020).
  187. Oue, M. *et al.* The Murine Stem Cell Virus Promoter Drives Correlated Transgene Expression in the Leukocytes and Cerebellar Purkinje Cells of Transgenic Mice. *PLoS One* **7**, (2012).
  188. Levy, C. *et al.* Baboon envelope pseudotyped lentiviral vectors efficiently transduce human B cells and allow active factor IX B cell secretion in vivo in NOD/SCID $\gamma$ c $^{-/-}$  mice. *J. Thromb. Haemost.* **14**, 2478–2492 (2016).
  189. Colamartino, A. B. L. *et al.* Efficient and Robust NK-Cell Transduction With Baboon Envelope Pseudotyped Lentivector. *Front. Immunol.* **10**, 2873 (2019).
  190. Bari, R. *et al.* A Distinct Subset of Highly Proliferative and Lentiviral Vector (LV)-Transducible NK Cells Define a Readily Engineered Subset for Adoptive Cellular Therapy. *Front. Immunol.* **10**, 2001 (2019).
  191. Salter, A. I. *et al.* Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci. Signal.* **11**, (2018).
  192. Cohen, A. D. *et al.* B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *J. Clin. Invest.* **129**, 2210–2221 (2019).
  193. Pont, M. J. *et al.*  $\gamma$ -Secretase inhibition increases efficacy of BCMA-specific chimeric antigen receptor T cells in multiple myeloma. *Blood* **134**, 1585–1597 (2019).
  194. Lee, D. W. *et al.* ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **25**, 625–638 (2019).
  195. Hunter, C. A. & Jones, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology* **16**, 448–457 (2015).

196. Parameswaran, N. & Patial, S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* **20**, 87–103 (2010).
197. Milone, M. C. *et al.* Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol. Ther.* **17**, 1453–1464 (2009).
198. Savan, R., Chan, T. & Young, H. A. Lentiviral gene transduction in human and mouse NK cell lines. *Methods Mol. Biol.* **612**, 209–221 (2010).
199. Carlsten, M. & Childs, R. W. Genetic manipulation of NK cells for cancer immunotherapy: Techniques and clinical implications. *Frontiers in Immunology* **6**, 266 (2015).
200. Micucci, F. *et al.* High-efficient lentiviral vector-mediated gene transfer into primary human NK cells. *Exp. Hematol.* **34**, 1344–1352 (2006).
201. Li, L. *et al.* Expression of chimeric antigen receptors in natural killer cells with a regulatory-compliant non-viral method. *Cancer Gene Ther.* **17**, 147–154 (2010).
202. Maasho, K., Marusina, A., Reynolds, N. M., Coligan, J. E. & Borrego, F. Efficient gene transfer into the human natural killer cell line, NKL, using the Amaxa nucleofection system<sup>TM</sup>. *J. Immunol. Methods* **284**, 133–140 (2004).
203. Bengsch, B. *et al.* Deep immune profiling by mass cytometry links human T and NK cell differentiation and cytotoxic molecule expression patterns. *J. Immunol. Methods* **453**, 3–10 (2018).
204. Sechler, J. M., Barlic, J., Grivel, J. C. & Murphy, P. M. IL-15 alters expression and function of the chemokine receptor CX3CR1 in human NK cells. *Cell. Immunol.* **230**, 99–108 (2004).
205. Liu, E. *et al.* Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia* **32**, 520–531 (2018).
206. Hoyer, K. K., Dooms, H., Barron, L. & Abbas, A. K. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol. Rev.* **226**, 19–28 (2008).
207. Liu, E. *et al.* Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors. *N. Engl. J. Med.* **382**, 545–553 (2020).
208. Matosevic, S. Viral and nonviral engineering of natural killer cells as emerging adoptive cancer immunotherapies. *J. Immunol. Res.* **2018**, (2018).

