



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:  
ÚLTIMOS AVANCES EN LA  
INMUNOTERAPIA DEL MIELOMA MÚLTIPLE:  
CÉLULAS T CAR**

Autor: Isabel Angulo Castaño

DNI: 06024274-E

Tutor: Marta Roderó Martínez

## **Resumen**

La comprensión de la base inmunopatológica del Mieloma Múltiple (MM), una neoplasia caracterizada por la proliferación de las células plasmáticas, se ha convertido en un auténtico reto para la comunidad científica, debido a la gran complejidad de los mecanismos responsables de la enfermedad. Inicialmente el tratamiento del MM se centró en terapias de soporte y terapias antitumorales activas. Sin embargo, estudios recientes han destacado el papel de la inmunoterapia o terapia biológica en el tratamiento del MM. El reciente éxito de la terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigida frente a CD19 en leucemia crónica y aguda ha llevado a un mayor interés en ampliar esta tecnología a otras neoplasias malignas hematológicas y tumores sólidos. Ahora, se están haciendo avances con la tecnología de células CAR T para atacar antígenos presentes en células responsables del mieloma como BCMA, CD138 y la cadena ligera kappa, así como CD19 en células madre de mieloma putativo. Hasta la fecha, solo unos pocos pacientes con mieloma múltiple han recibido terapia con células CAR-T, pero los resultados preliminares han sido alentadores. En esta revisión, resumimos los resultados recientemente obtenidos en los ensayos clínicos realizados con la terapia de células T CAR en MM.

## **Abstract**

The compression of the immunopathological base of Multiple Myeloma (MM), a neoplasm characterized by the proliferation of plasma cells, has become a real challenge for the scientific community, due to the great complexity of the mechanisms responsible of the disease. Initially MM treatment focused on supportive therapies and active antitumor therapies. However, recent studies have highlighted the role of immunotherapy or biological therapy in the treatment of MM. The recent clinical success of CD19 directed chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy in chronic and acute leukemia has led to increased interest in broadening this technology to other hematological malignancies and solid tumors. Now, advances are being made using CAR T cell technology to target myeloma antigens such as BCMA, CD138 and kappa-light chain as well as CD19 on putative myeloma stem cells. To date, only a limited multiple myeloma patients have received CAR-T cell therapy but preliminary results have been encouraging. In this review, we summarize the recently reported results of clinical trials conducted utilizing CAR T-cell therapy in MM.

## **Introducción y antecedentes**

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. A lo largo de los años, se han desarrollado una serie de enfoques citotóxicos convencionales para las enfermedades neoplásicas. Sin embargo, debido a su eficacia limitada de acuerdo con la heterogeneidad de las células cancerosas, existe una búsqueda constante de enfoques terapéuticos con mejores resultados como la inmunoterapia, que utiliza y mejora la capacidad normal del sistema inmunitario del paciente.

El mieloma múltiple (MM) es una enfermedad hematológica maligna de las células plasmáticas que permanece incurable para la mayoría de los pacientes a pesar de las mejoras significativas logradas con la terapia moderna. Es una neoplasia crónica de células plasmáticas que representa aproximadamente el 10% de las neoplasias hematológicas. La edad media de inicio es de 66 años, y solo el 2% de los pacientes tienen menos de 40 años en el momento del diagnóstico. El MM evoluciona a partir de una afección pre-maligna clínicamente reconocida como gammapatía monoclonal. Está presente en el 3-4% de la población general mayor de 50 años. Es en su mayoría asintomática y se detecta a menudo como un hallazgo incidental de laboratorio; solo el 10% de los pacientes con diagnóstico reciente de MM tienen antecedentes de gammapatía monoclonal preexistente. <sup>1</sup>

Hasta el año 2000, el pilar de la terapia de MM se basaba en el uso de fármacos alquilantes y corticosteroides, y en pacientes seleccionados, quimioterapia de alta dosis con trasplante autólogo de células madre (TACA). Posteriormente, la talidomida, bortezomib y lenalidomida, se mostraron como agentes efectivos y mejoraron considerablemente los resultados clínicos. Más recientemente, se han aprobado como nuevos fármacos carfilzomib, pomalidomida y panobinostat en los Estados Unidos para el tratamiento del MM, lo que aumenta sustancialmente el número de pautas de tratamiento disponibles para los pacientes en todas las etapas de la enfermedad. <sup>1,2</sup>

La evasión tumoral es un proceso clave en la patogénesis del MM en donde un sistema inmunitario comprometido se asocia con formas más agresivas de la enfermedad. En contraste, la aparición de respuestas inmunitarias específicas frente a células del mieloma después del trasplante de células madre autólogas y alogénicas se asocia con un mejor pronóstico. Las terapias de células T-CAR para MM se encuentran en una etapa temprana de desarrollo clínico. Hasta la fecha, las células T anti-BCMA CAR han mostrado los mejores resultados en los ensayos clínicos de fase temprana, pero presentan efectos secundarios como el síndrome de liberación de citoquinas (CRS) y la neurotoxicidad. Las áreas actuales de investigación en terapias con células T-CAR incluyen el uso de la edición de genes para mejorar su efectividad y seguridad, la integración de las células T-CAR con otras terapias (medicamentos inmunomoduladores, inhibidores del punto de control) y las células T-CAR para atacar múltiples antígenos. <sup>3</sup>

La terapia de células T con el receptor de antígeno quimérico (CAR) es una terapia individualizada que aprovecha la función protectora natural de los linfocitos T del paciente. Implica la modificación genética de las células T autólogas del paciente para expresar un receptor CAR específico frente a un antígeno tumoral, seguida de la expansión de células ex vivo y la reinfusión de las mismas de nuevo al paciente. Los ensayos clínicos han mostrado resultados muy prometedores. <sup>4,5</sup>

El notable éxito de las células CAR T en el tratamiento de la ALL (Leucemia linfoblástica aguda), CLL (Leucemia linfocítica crónica) y DLBCL (Linfoma difuso de células B grandes) en recaídas y refractaria ha fomentado el desarrollo de dichas células para el tratamiento del MM. Un factor clave en el desarrollo de una CAR exitosa es la elección de un antígeno de superficie adecuado que esté presente en las células cancerosas y al mismo tiempo ausente en las células normales. Actualmente, se están estudiando activamente en los ensayos clínicos múltiples dianas antigénicas, incluido el antígeno de maduración de células B (BCMA), CD19, cadena ligera kappa, CD138.<sup>4,5</sup>

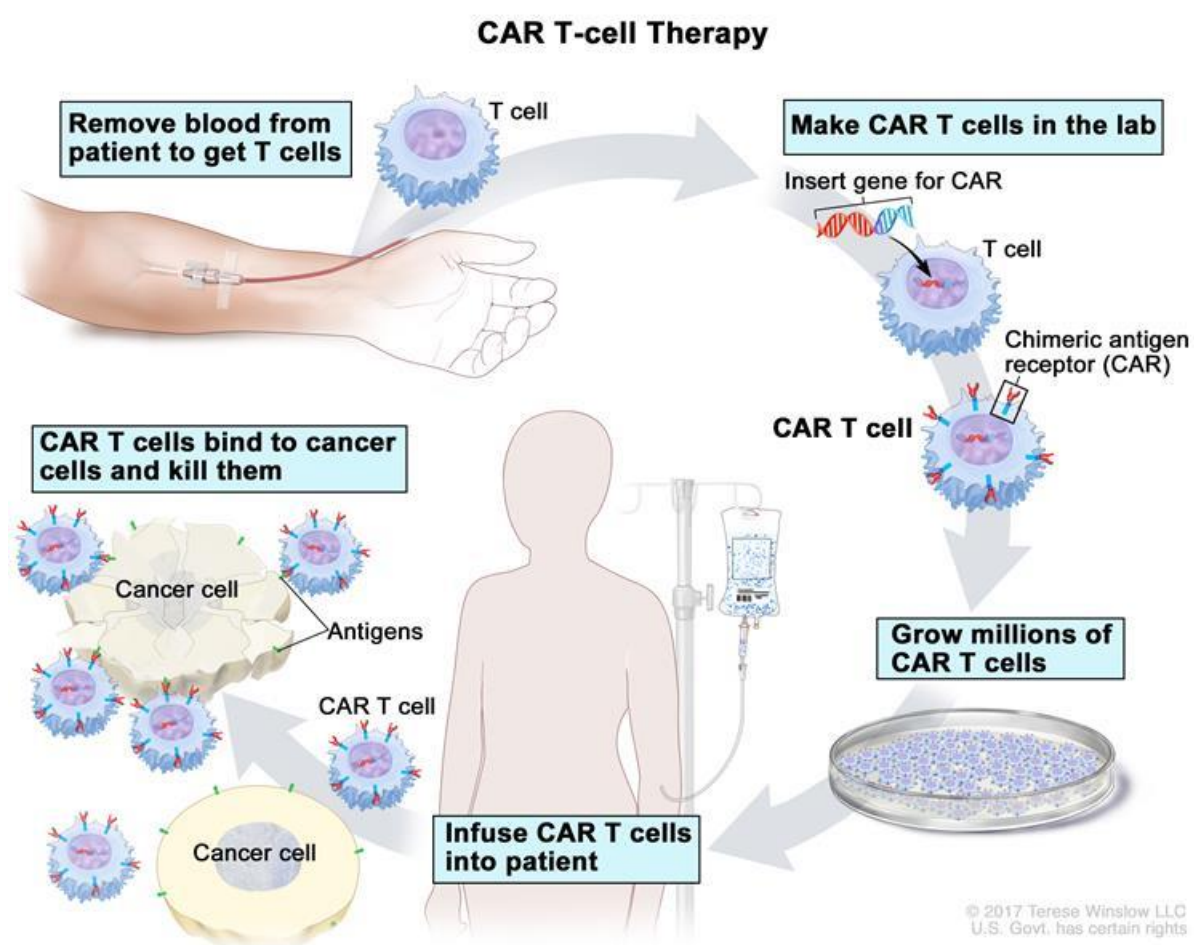


Figura 1- National Cancer Institute. NCI Dictionary of Cancer Terms

## Objetivos

El objetivo de este trabajo consiste en profundizar en los mecanismos de la inmunoterapia que se considera más prometedora para el MM, las células T-CAR, mediante una revisión bibliográfica exhaustiva de las principales dianas y mecanismos de acción de cada terapia.

## Material y métodos

Para la realización del presente trabajo se han consultado numerosos artículos y ensayos, tanto en inglés como en español. Las bases de datos utilizadas para la revisión de dichos artículos han sido PubMed, Google Académico y Medline entre otras. Los términos empleados para la búsqueda bibliográfica han sido “mieloma múltiple” “car t cells” “inmunoterapia” “BCMA”

## Resultados y Discusión

Los resultados de un ensayo clínico preliminar presentado en la Reunión anual de la ASCO (Sociedad Americana de Oncología Clínica) de 2017, mostraron que un tipo de terapia de células T-CAR dirigido frente a un biomarcador conocido como antígeno de maduración de células B (B-cell maturation antigen, BCMA) puede disminuir el desarrollo del mieloma múltiple. Este estudio incluyó a 35 pacientes con enfermedad recidivante o refractaria. De esos 35 pacientes, 33 (el 94 %) experimentaron la remisión del mieloma múltiple en los 2 meses posteriores tras el tratamiento con las células T-CAR anti-BCMA. Sin embargo existen otras dianas farmacológicas que parecen ser incluso mejores para el tratamiento del MM como por ejemplo GPRC5D.<sup>2</sup>

### Receptores de Antígenos Quiméricos (CARs: quimeric antigen receptor)

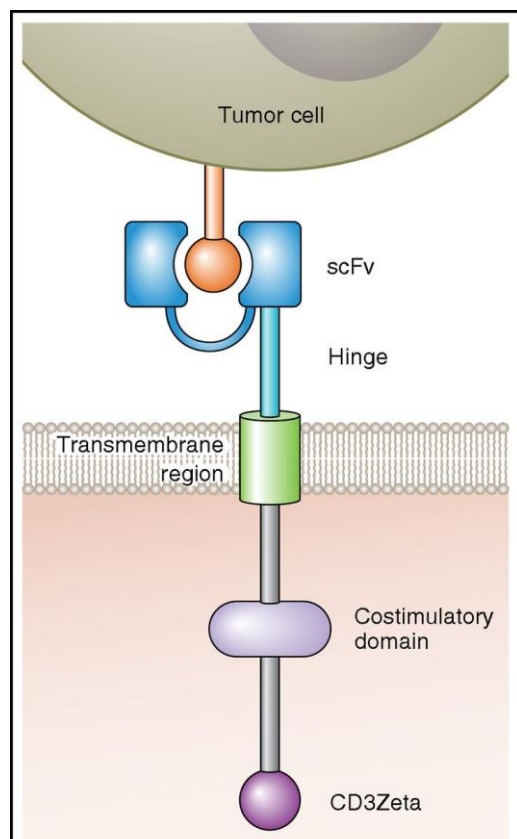


Figura 2- Diagrama de la estructura de un receptor de antígeno quimérico. Ilustración de Patrick Lane ,ScEYence Studios.

El éxito que ha tenido el autotransplante de células T-CAR con un antígeno quimérico (CAR) frente a la molécula CD19 en leucemia linfoblástica aguda (ALL)<sup>6,7</sup> y leucemia linfocítica crónica (CLL)<sup>8,9</sup> han despertado el interés de expandir esta técnica a otras enfermedades hematológicas malignas y tumores sólidos. Las células T-CAR están genéticamente modificadas para expresar el receptor de antígeno quimérico (CARs) que reconocen el antígeno de superficie del tumor. En condiciones ideales, los antígenos asociados a este tumor se expresarán únicamente en las células malignas. Los CARs tienen 2 dominios: uno de ellos de reconocimiento de antígeno y otro dominio de transmisión de la señal. Aquellas células T que expresen este receptor van a ser capaces de reconocer específicamente al antígeno diana.<sup>10</sup>

El dominio de unión al antígeno está unido al dominio intracelular que envía la señal mediante una bisagra y un dominio transmembrana que derivan de CD8 y de IgG4. El dominio de unión al antígeno es

normalmente un dominio scFv derivado de un anticuerpo monoclonal, mientras que el dominio coestimulador es por ejemplo CD28, 41BB y OX40 o coestimulador inmune de células T, y el dominio de activación de las células T es una molécula CD3Zeta.<sup>11,12,14</sup>

La inclusión de los dominios coestimuladores en los receptores CAR ha sido un paso crítico en el desarrollo de las terapias T CAR<sup>12,13</sup>. El dominio CD3Zeta era suficiente para activar la respuesta de las células T, pero sin embargo la señal transmitida era débil por lo que en la segunda generación de receptores T CAR, se adicionaron los dominios coestimuladores para amplificar la transmisión de la señal. La adición de CD28, 41BB, OX40 y el coestimulador inmune de las células T ha llevado a una mayor producción de citoquinas y ha mejorado la capacidad citolítica de los receptores CAR. Los más utilizados son el CD28 y 41BB. Si comparamos la primera y la segunda generación de receptores CAR han demostrado una mayor supremacía los de segunda generación. Actualmente se han desarrollado receptores CAR que incluyen 2 dominios coestimuladores, dando lugar a los receptores de 3ª generación, pero el uso de estos no han mostrando un incremento de la eficacia en comparación con los de 2ª generación.<sup>15,16</sup>

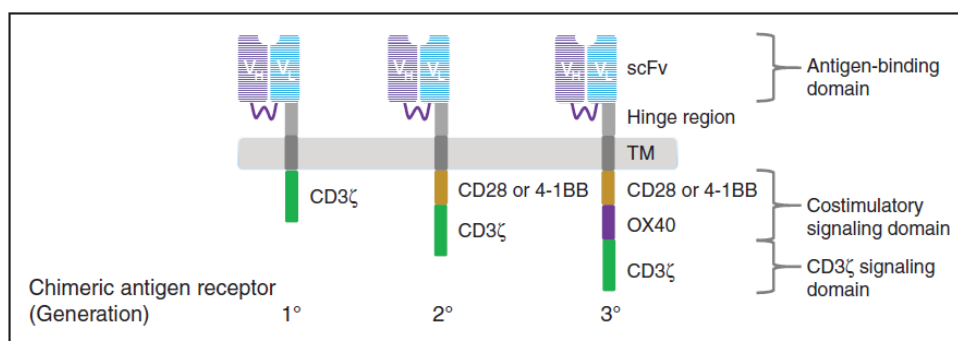


Figura 3- Las tres generaciones de receptores de antígenos quiméricos. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*.

La producción de los receptores CAR comienza con el cultivo de las células T extraídas de la sangre del paciente, para inducir su proliferación. Estas células T extraídas se modifican genéticamente, insertando un gen artificial para que expresen los receptores CAR utilizando un  $\gamma$ -retrovirus, lentivirus o transposones. Estas células T ya provistas del receptor CAR que reconoce un antígeno específico del MM se multiplican en el laboratorio, para posteriormente proceder su la infusión en el paciente.<sup>2</sup>

### **Justificación para el desarrollo de la terapia T-CAR para Mieloma Múltiple**

Una de las principales razones de los actuales esfuerzos para el desarrollo de la terapia T-CAR para el Mieloma Múltiple es la sorprendente actividad de las anti-CD19 T-CAR frente a la leucemia y diferentes linfomas.

Las células T que expresan receptores anti-CD19 pueden causar una remisión completa de las células B malignas de forma duradera. Los resultados sorprendentes de la terapia anti-CD19 T-CAR en los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda es la razón por la cual se ha desarrollado

la terapia T-CAR frente a el Mieloma Múltiple debido a la extensa implicación de la médula en ambas patologías.<sup>17,18</sup>

### **Toxicidad de las células T-CAR**

---

La toxicidad del tratamiento con células T-CAR se puede dividir en los efectos relacionados y no relacionados con el tumor así como en los efectos sistémicos. Uno de los mayores problemas a la hora de desarrollar nuevas CAR es la identificación del antígeno adecuado y único presente en el tumor. En condiciones ideales, el antígeno diana debería ser específico del tumor y jugar un papel fundamental en mantener la tumorigenicidad de forma que podamos limitar los mecanismos de evasión de las células cancerosas, además debería estar ausente en las células vitales. Dentro de la toxicidad de esta terapia encontramos el síndrome de liberación de citoquinas (CRS: cytokine release syndrome), neurotoxicidad y anafilaxia.<sup>20,21</sup>

Uno de los grandes problemas de la terapia de células T-CAR, radica en que si el antígeno diana se expresa tanto en las células malignas como en las células vitales, aunque sea en menor medida, esto puede tener consecuencias fatales<sup>16</sup>. La incorporación de un “gen suicida” dentro de la estructura de la T-CAR permite la eliminación del CAR de las células T en caso de toxicidad. El hecho de que esta estrategia sea beneficiosa depende de la rapidez de eliminación de las células T-CAR. Otra estrategia se basa en la modificación, por ingeniería genética, de las células T -CAR para expresar un receptor de quimioquina que le permita dirigirse directamente al tumor y minimizar así, el tráfico por las zonas no tumorales.<sup>20,21,22,23,24,25</sup>

CRS (Síndrome de liberación de citoquinas) es una reacción adversa presente en los tratamientos de enfermedades hematológicas malignas con células T-CAR. En la mayoría de los pacientes los síntomas del CRS son ligeros e incluyen síntomas gripales como fiebre o ligera hipotensión, hipoxia, coagulopatías, aunque todas ellas pueden llevar a un fallo multiorgánico fatal.<sup>22,23</sup>

El cuadro de CRS provoca una activación de la respuesta inmune que se manifiesta por un aumento de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  y del factor estimulador de colonias- macrófago granulocito (GM-CSF). La incidencia y severidad de los pacientes con mieloma múltiple en tratamiento con células T-CAR que presenten CRS no ha sido todavía definida. Uno de los problemas al tratar el CRS es conseguir un tratamiento que consiga reducir la respuesta inflamatoria incontrolada sin reducir la eficacia de las células T-CAR. Tradicionalmente, el control del síndrome de liberación de citoquinas consiste en la administración de glucocorticoides sistémicos, aunque sin embargo, su administración prolongada puede frenar el efecto de las células T-CAR. Debido al papel de la IL-6 en el CRS las nuevas terapias han consistido en la administración de un antagonista del receptor de IL-6 como es el anticuerpo tocilizumab. La eficacia de la combinación del bloqueo de los receptores de IL-6 y la terapia CAR aún está bajo investigación, pero los últimos datos sobre la eficacia del uso de agentes anti-citoquinas no limitan la eficacia anti-tumoral de las células T-CAR.<sup>23,24,25</sup>

## **Selección del antígeno diana**

---

Un factor crítico en la determinación del éxito o fracaso de la terapia T-CAR es la elección del antígeno diana. Es importante que el antígeno seleccionado se exprese uniformemente y únicamente en las células malignas del Mieloma Múltiple.

El MM se caracteriza por una gran heterogeneidad genética y fenotípica de las células cancerosas entre los diferentes pacientes, incluyendo una gran variabilidad en los antígenos de superficie. Dado que la expresión de estos antígenos puede variar en las células de MM del mismo paciente, es necesario dirigir el tratamiento frente a más de un antígeno para optimizar el tratamiento con T-CAR.<sup>10</sup>

### **➤ CD19**

Las células T-CAR dirigidas frente a la molécula CD19 han demostrado una gran eficacia en la Leucemia Linfocítica Crónica y Leucemia Linfoblástica Aguda. La expresión de CD19 no está relacionada con el MM y no se considera una diana para esta enfermedad. Pero a pesar de la falta de expresión de CD19 en las células del MM, algunos estudios han identificado su expresión en un pequeño grupo de células madre haciendo a CD19 una diana potencial para el tratamiento de las recurrencias. Este subgrupo de células madre del MM se han asociado con las diferentes resistencias al tratamiento y son los responsables de la no curación de esta enfermedad.<sup>26,27</sup>

A raíz de esta observación se comenzó a considerar el tratamiento T-CAR frente a CD19, así los autores Garfall y Maus et al. Trataron a un paciente de MM con T-CAR anti-CD19-IBB-CD3ζ (CTL019). Este paciente recibió una infusión de células CTL019, seguido de una alta dosis de Melfalán (alquilante de acción citotóxica) y un autotransplante de células madre. No se detectaron fiebre ni otros síntomas del CRS, a pesar de detectarse células CTL019 en sangre y médula hasta 47 días después de la infusión. A continuación, comenzó el tratamiento con lenalidomida durante tres meses y la evaluación de la enfermedad 12 meses después demostró la permanencia de una respuesta completa a CTL019. Esta respuesta se ha conseguido a pesar de la ausencia de expresión de CD19 en el 99,95% de las células malignas de los pacientes del MM.<sup>27,28</sup>

En la reunión general anual del ASH (American Society of Hematology) en diciembre de 2016, investigadores de la Universidad de Pensilvania presentaron datos actualizados del tratamiento seguro y fiable para el MM con CTL019. En total, 12 pacientes se incluyeron en este estudio, 10 de los cuales recibieron la infusión de CTL019 ( $5 \times 10^7$  células CAR), 12-14 días después de una alta dosis de Melafán y del autotransplante de células madre. El tratamiento resultó en una mediana de supervivencia libre de progresión de 185 días. En cuanto a los efectos adversos sólo se observaron ligeros síntomas de CRS y fue tolerado de forma correcta. Aunque CD19 se exprese de forma anómala en las células del MM, la presencia de CD19 en las células madre de la población hace a CD19 una diana potencial en combinación con otras terapias.<sup>28</sup>



### ➤ **CD138**

La molécula CD138 también conocida como syndecan-1 es un heparán-sulfato proteoglicano con función en la adhesión celular. CD138 se expresa en la mayoría de las células plasmáticas y células del MM, estando más elevada en pacientes que tienen progresión de la enfermedad o enfermedad recidivante. La expresión de CD138 se encuentra en las células epiteliales de órganos como las glándulas salivares, hígado y piel.<sup>29,30</sup>

Cinco pacientes con enfermedad refractaria y recidivante fueron tratados con células T-CAR anti-CD138. Todos ellos expresaban CD138 en su médula ósea. Las células mononucleares de sangre periférica fueron aisladas y cultivadas con IFN- $\gamma$  e IL-2 seguido de una transducción con lentivirus que codifica un anti-CD138 CAR que al unirse a CD138 producen células natural killer inducidas por citoquinas. Después de la adecuada quimioterapia y la infusión de anti-CD138, este gen CAR persistió en la sangre hasta 4 semanas después de la infusión. La toxicidad se basaba en CRS y, curiosamente, no se detectó toxicidad epitelial. Cuatro de los cinco pacientes se mantuvieron estables y sólo uno de ellos tuvo progresión de la enfermedad por lo que fue tratado con cuidados paliativos a pesar de detectarse niveles de anti-CD138 hasta 90 días después de la infusión. Se infundieron una media de  $0,7563 \times 10^7$ /kg células natural killer inducidas por citoquinas, y un 31% de estas expresaban anti-CD138.<sup>29,30,31</sup>

### ➤ **Cadena ligera Kappa ( $\kappa$ )**

Sabiendo que los linfocitos B maduros expresan o bien la cadena ligera kappa o lambda, pero no ambas, Ramos et al. en 2018 desarrolló un receptor CAR que pudiera reconocer aquellas células que expresaran kappa, e ignorando al subgrupo que expresara las cadenas lambda  $\lambda$ , manteniendo una inmunidad humoral parcial. Aunque las células plasmáticas no expresan inmunoglobulinas de superficie, concluyeron que la cadena kappa era una diana potencial para el tratamiento del MM ya que se ha observado una expresión de inmunoglobulinas de superficie en la población con inicio de MM. En la primera fase de la enfermedad se trata a estos pacientes con células T CAR CD28-CD3 $\zeta$  contra la cadena ligera  $\kappa$ . Pacientes que recibieron 1-2 infusiones de T-CAR redujeron en un 50% el número de células B en las dos primeras semanas de tratamiento. Cuatro de siete pacientes experimentaron una buena respuesta a la infusión manteniéndose estables durante más de 24 meses con enfermedad mínima residual. Las células T-CAR fueron bien toleradas y ningún paciente experimentó síntomas de CRS.<sup>32</sup>

### ➤ **BCMA (B cell maturation antigen): Antígeno de maduración de células B**

BCMA es una proteína presente en la superficie celular de las células B y en las células del mieloma múltiple en todos los estadios de la enfermedad. Está involucrada en la diferenciación y maduración de las células B en células plasmáticas, y además se encarga de mandar una señal anti-apoptótica por lo que es considerada una diana en la inmunoterapia.<sup>33,34,35</sup>

Los primeros resultados del tratamiento con células T-CAR anti-BCMA de segunda generación con CD28 fueron publicados por Ali *et al.* en 2016. Para ello diseñaron un estudio en fase I con una cohorte de 12 pacientes y una dosificación en escala. Los pacientes recibieron una dosis entre 0,3, 1, 3 o  $9 \times 10^6$  células T-CAR por kg. Más importante que la infusión de células T-

CAR es el tratamiento de linfodepleción con ciclofosfamida/fludarabine. Los pacientes que recibieron las dosis más altas experimentaron efectos adversos más pronunciados, incluyendo CRS, pero también obtuvieron las mejores respuestas. Ocho de los doce pacientes se mantuvieron estables SD (n=8), 1 paciente generó una respuesta completa CR (n=1), 1 paciente una respuesta parcial PR (n=1) y 1 paciente con respuesta parcial excelente VGPR (n=1).<sup>33,34</sup>

La Universidad de Pensilvania presentó datos de un estudio en fase I con teplaia CAR anti-BCMA de segunda generación con 4-1BB-CD3 $\zeta$ . Un grupo de 6 pacientes, recibieron células T-CAR anti-BCMA en dosis escaladas (10% en el día 0, 30% en el día 1 y 60% día 2).

Cinco de los seis pacientes experimentaron toxicidad y dos de los pacientes requirieron tratamiento con tocilizumab deteniéndose la infusión por lo que esta fue incompleta; a pesar de ello demostraron tener una respuesta completa o una respuesta parcial muy buena al tratamiento. Los otros 4 pacientes experimentaron una respuesta mínima o progresión de la enfermedad, salvo uno de ellos que se amntuvo estable. Hubo una mínima expansión de las células T-CAR correlacionada con las respuestas más pobres.<sup>36,37</sup>

En diciembre de 2016 se presentaron datos sobre un grupo de 9 pacientes con MM recidivante o refractario que recibieron una infusión de células T-CAR anti BCMA de segunda generación con moléculas coestimuladoras 4-1BB, el producto se denominó bb2121. Los pacientes recibieron una única infusión de bb2121 a diferentes dosis (5, 15 o 45 x 10<sup>7</sup> células T-CAR) después del tratamiento con ciclofosfamida/fludarabine. En todos los pacientes, hubo una expansión de las células T-CAR y persistieron entre 4 y 24 semanas tras la infusión. La mejor respuesta se obtuvo con una dosis de 15x 10<sup>7</sup> células T-CAR en 2 pacientes mostrando una respuesta completa. Sin embargo todos los pacientes experimentaron una progresión de la enfermedad entre 8 y 11 semanas tras la infusión.<sup>36,38,39</sup>

A pesar de los fracasos obtenidos, los resultados clínicos recientes de la terapia CAR frente al antígeno de maduración de células B son prometedores. De todas formas, aunque BCMA se expresa en la mayoría de células malignas del MM esta expresión es heterogénea, dando lugar a respuestas variables frente al mismo tratamiento. Además la expresión de BCMA en la superficie de las células malignas varía a lo largo del tiempo debido al desprendimiento del dominio extracelular mediado por la  $\gamma$ -secretasa. En aquellos pacientes con enfermedad recidivante tras el tratamiento con células T-CAR anti-BCMA han demostrado tener disminuida o inactivada el BCMA. El desarrollo de inmunoterapias para dianas adicionales pueden ser efectivas para el tratamiento de pacientes con baja expresión de BCMA o ausencia de expresión.<sup>39</sup>

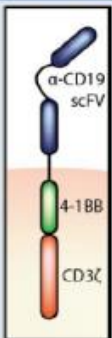
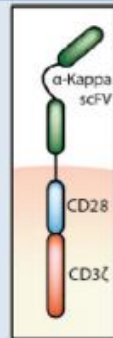
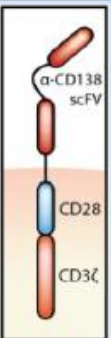
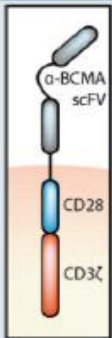
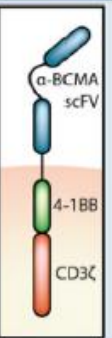
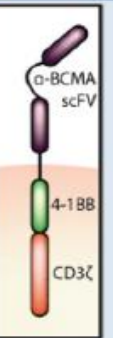
	$\alpha$ -CD19-BBz	$\alpha$ -Kappa-28z	$\alpha$ -CD138-28z	$\alpha$ -BCMA-28z	$\alpha$ -BCMA-BBz	$\alpha$ -BCMA-BBz
						
<b>Institution</b>	Penn	Baylor	Chinese PLA General Hospital	NCI	Penn	bluebird bio
<b>scFV Clone</b>	FMC63	CRL-1758	NK-92	11D5-3	ND	bb2121
<b>scFV Origin</b>	Murine	Murine	Murine	Murine	Human	Humanized
<b>Gene Transfer System</b>	Lentivirus	Retrovirus	Lentivirus	Retrovirus	Lentivirus	Lentivirus
<b>Intracellular Domain</b>	4-1BB ICD-CD3zeta	CD28 ICD-CD3zeta	CD28 ICD-CD3zeta	CD28 ICD-CD3zeta	4-1BB ICD-CD3zeta	4-1BB ICD-CD3zeta
<b>Patients Treated</b>	11	8	5	12	6	9
<b>Dose(s)</b>	1-5e7 CARTs/pt	0.2-2e8 CARTs/m2	0.44-1.51e7 CARTs/kg	0.3-9e6 CARTs/kg	1e7-5e8 CARTs/pt	5-80e7 CARTs/pt
<b>Best Response (number of patients)</b>	CR (1), VGPR (6), PR (2), PD (2)	SD (5), NR (3)	SD (4), PD (1)	Stringent CR (1), VGPR (2), PR (1), SD (8)	Stringent CR (1), VGPR (1), SD (1), MR (2), PD (1)	Stringent CR (2), VGPR (1), PR (4), SD (1), PD (1)
<b>Reference(s)</b>	27	31	29	32	33	ASH 2016 Abstract

Figura 4- Cuadro comparativo de las diferentes células T que han sido utilizadas en inmunoterapia. *Curr Hematol Malig Rep.* 2017 April.

### ➤ GPRC5D

Una alternativa potencial como diana de las células T-CAR es el receptor huérfano de proteína G, de la clase C, grupo 5, miembro D (GPRC5D). Como he observado en trabajos recientes han descubierto la expresión de GPRC5D en dos localizaciones anatómicas: en el folículo piloso y la médula ósea de pacientes con MM. Dos estudios recientes han identificado el RNAm de GPRC5D en la médula espinal de los pacientes con MM; sin embargo en algunos pacientes dicha molécula no se expresa por lo que hasta el momento, la evidencia de la expresión de la proteína GPRC5D así como la evaluación de la toxicidad no son concluyentes.<sup>40,42</sup>

Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se ha demostrado que GPRC5D se expresa en las células plasmáticas malignas de médula ósea, mientras que en tejidos normales sólo se encuentra en el folículo piloso. Se ha desarrollado y evaluado una terapia T-CAR frente a GPRC5D. Utilizando un gen marcador (gen que los investigadores vinculan a una secuencia regulatoria de otro gen de interés) identificaron receptores óptimos CAR que proporcionan una evidencia preclínica de que la terapia candidata es segura y efectiva.<sup>41,42,43</sup>

## Expresión de GPRC5D en las células del MM

En la búsqueda de dianas potenciales para la inmunoterapia en MM, se tratan de identificar antígenos con una elevada expresión en células plasmáticas del MM y limitada en células de tejidos normales.<sup>40,44</sup>

Para ello se llevó a cabo la evaluación de la expresión de RNAm de GPRC5D en más de 1000 diferentes líneas celulares malignas, incluyendo 30 líneas celulares del MM. Como control se utilizó SDC1 (CD138), un marcador común de células plasmáticas normales y malignas. Aunque SDC1 se expresa de forma elevada en líneas celulares del MM, también se expresa en las líneas celulares de prácticamente cualquier tumor, llegando a su máxima expresión en los tumores del tracto digestivo. El RNAm de GPRC5D se expresa abundantemente en las células del MM, pero a diferencia de SDC1, no se expresa de manera substancial en otros tumores (Fig 5A).<sup>40,45,46</sup>

De forma similar, al analizar los datos de la expresión genotípica de los tejidos, se demostró que había una alta expresión de SDC1 en tejidos normales como esófago, piel, pulmones e hígado, mientras que GPRC5D no se expresaba de forma elevada en ningún tejido normal, salvo la piel, en la cual su expresión era variable. Sin embargo la expresión de RNA en muestras de médula ósea humana mostraron que las células malignas y normales expresaban entre 1000 y 500 veces más RNAm de GPRC5D que las células B de la sangre periférica, respectivamente (Fig 5B).<sup>40, 48</sup>

Para evaluar la relación entre la expresión de GPRC5D y los resultados clínicos, el MMRF (Multiple Myeloma Research Foundation) realizó en 2017 un estudio longitudinal llamado CoMMpass (NCT014529) donde se analizó la expresión de secuencias de RNA de CD138 en 765 pacientes. Una investigación previa independiente de CoMMpas, observó que la expresión de GPRC5D por encima de la mediana, se correlacionaba con un peor pronóstico de la enfermedad, lo cual fue confirmado en el estudio CoMMpass.<sup>40,46,47</sup>

Para evaluar la expresión de GPRC5D en las células del MM se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas específicas para GPRC5D que se consiguió mediante técnicas de ingeniería genética. También se llevaron a cabo varias inmunofluorescencias cuantitativas para CD138, BCMA y GPRC5D en muestras de médula ósea, como se muestran en las imágenes de la figura 6A. Usando como punto de corte  $\geq 50\%$  de expresión del antígeno en células CD138+, que han sido utilizadas para otros tratamientos CAR con diana en BCMA (NCT02215967 y NCT02658929), observamos que el 65% (54 de 83) de las muestras tienen la expresión por encima de este nivel, 73% (61 de 83) cumplen este límite para BCMA, y el 88% (73 de 83) cumplen este límite cuando se consideran tanto la expresión de BCMA como de GPRC5D. (Fig 6B Y C).<sup>40,46</sup>

En el estudio CoMMpass examinaron mediante inmunotinciones la expresión de GPRC5D en 30 tejidos primarios procedentes de tres donantes y observaron 24 de ellos no expresaban la proteína GPRC5D. De aquellos tejidos que presentaban alguna señal positiva a la tinción se repitieron en muestras de primates (mono cynomolgus; 96% de los aminoácidos homólogos a los humanos) y se obtuvieron resultados similares. De entre los tejidos normales, la técnica de

inmunohistoquímica salió positiva en células del folículo piloso, único tejido en el que se confirmó la presencia de RNA de GPRC5D y mediante extracción del RNA y una PCR. En las células de la piel, la PCR dio una señal positiva muy débil.<sup>40,46,48</sup>

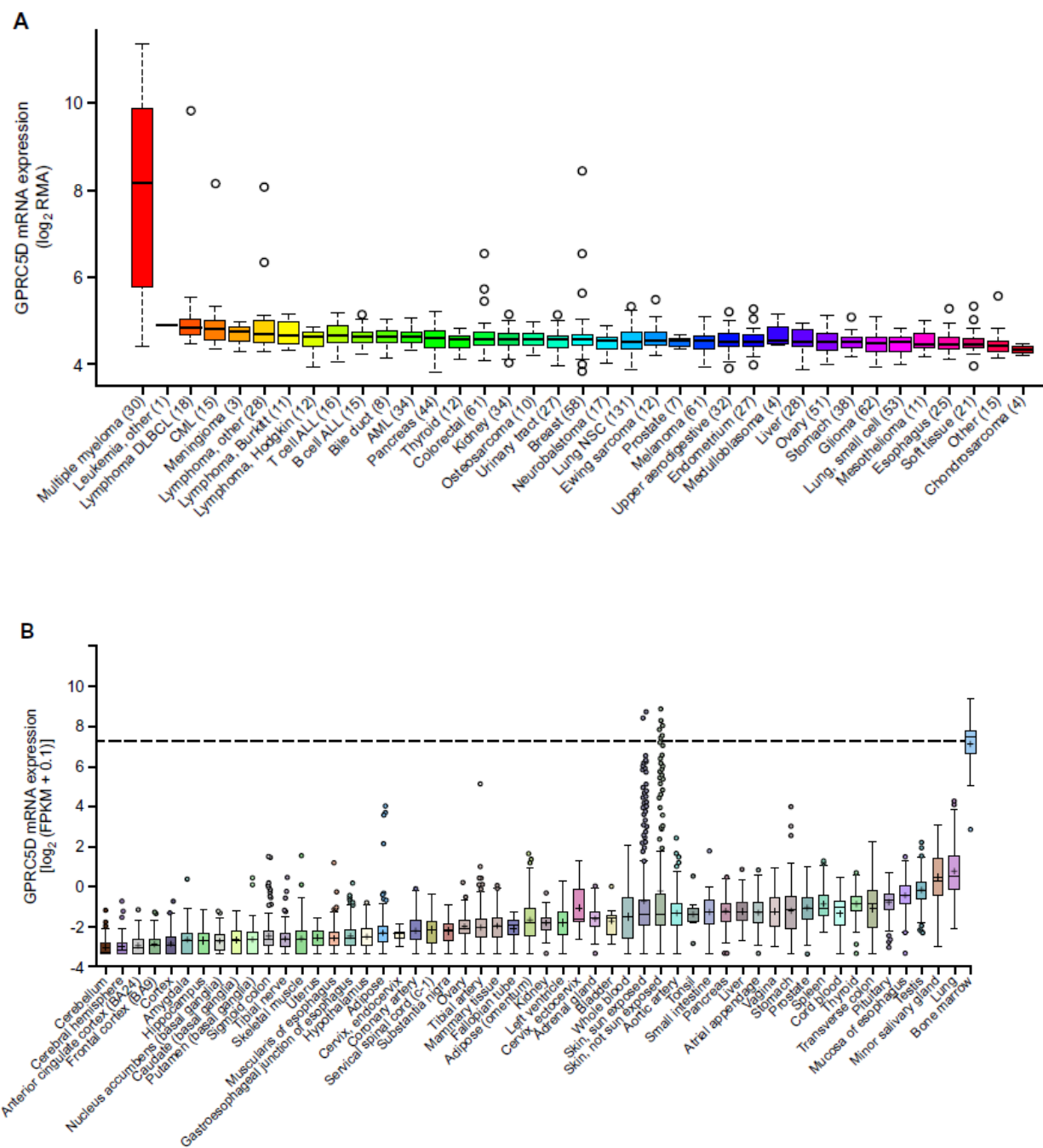


Figura 5- Gráficas donde se muestra la elevada expresión de GPRC5D en las células del MM y su expresión variable en la piel. Smith et al., Sci. Transl. Med. **11**, eaau7746 (2019) 27 March 2019

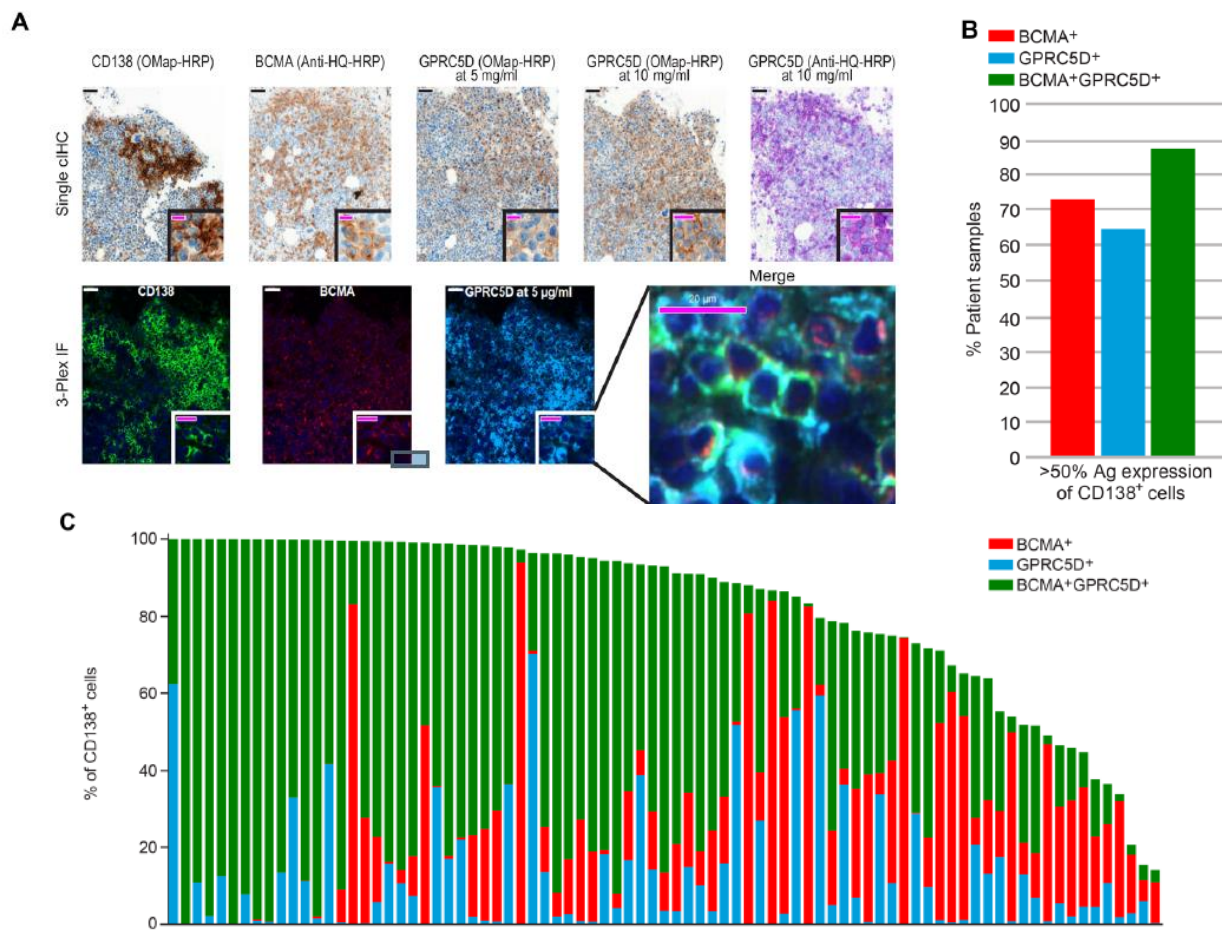


Figura 6- Imágenes y gráficas de la expresión de GPRC5D en las células del MM. Smith et al., Sci. Transl. Med. **11**, eaau7746 (2019) 27 March 2019

### Desarrollo del receptor CAR con diana en GPRC5D

Para seleccionar e identificar el dominio scFv, específico de GPRC5D, se utilizaron fibroblastos NIH-3T3 los cuales fueron traducidos con DNA de GPRC5D humano, usando un retrovirus con el fin de generar células presentadoras de antígenos (hGPRC5D-aAPCs). La expresión de GPRC5D en estas células se confirmó mediante citometría de flujo. hGPRC5D-aAPCs se utilizaron para seleccionar los scFvs específicos de GPRC5D desde un scFv derivado de una célula B humana mediante la visualización de fagos (una técnica de laboratorio para el estudio de las interacciones proteína-proteína, proteína-péptido y proteína-ADN que utiliza bacteriófagos para conectar proteínas con la información genética que las codifica). De esta forma se identificaron 32 clones, de los cuales 7 de ellos presentaban una mayor unión específica a las líneas celulares del MM, y una ausencia de unión a las líneas celulares que no expresaban GPRC5D, por lo que fueron seleccionados para el desarrollo de las estructuras CAR.<sup>40,41,42</sup>

Para seleccionar el scFv adecuado para el desarrollo clínico del receptor CAR, incorporaron mediante ingeniería genética los 7 scFv seleccionados para GPRC5D en un total de 42

estructuras CAR diferentes. Todas estas estructuras CAR contenían un dominio CD28 transmembrana y dominios coestimuladores 4-1BB y CD3 $\zeta$ .<sup>40</sup>

Para minimizar las señales independientes de antígenos (tónicas), que han demostrado ser un factor adverso para la actividad del tratamiento, se seleccionaron aquellas estructuras CAR que tenían disminuido este efecto. Los dominios scFvs fueron evaluados usando una línea celular denominada Jukart, que expresa un marcador (RFP: Red Fluorescent Protein) en la estructura de un receptor Nurr77. Esta estructura Nurr77-RFP sirve como sustituto para la activación de las células T. Para evaluar las señales específicas de antígenos, las células CAR-GFP (CAR-Green Fluorescent Protein) con el Jukart Nurr77-RFP fueron cocultivadas con células del MM (1:2), que expresan GPRC5D y el RFP fue medido tras 20 horas, para mostrar que células GFP+ eran también RFP+. Los resultados de este ensayo demostraron que la incorporación de espaciadores de mayor longitud en la estructura aumentaban las señales dependientes de antígenos y disminuían las señales independientes de antígeno (tónicas).<sup>40,52</sup>

Confirmando los resultados de este ensayo, aquellas células T que incorporaban un scFv específico de GPRC5D (por ejemplo, el clon 109, que incorporaba un espaciador de mayor longitud) demostraron mayor actividad *in-vivo* que aquellas estructuras CAR con otros scFvs.<sup>52</sup>

Finalmente, cabe destacar el papel que ha demostrado tener las células T-CAR como diana frente a GPRC5D para el tratamiento del MM. No se ha confirmado aún como afecta la expresión de BCMA en la terapia CAR con diana en BCMA, pero es posible que el desarrollo de estas células T-CAR, incrementen la frecuencia, profundidad y duración de las respuestas para aquellos pacientes que presenten baja expresión o ausencia de BCMA. La investigación clínica de la terapia contra GPRC5D para aquellos pacientes con MM avanzado debería ser prioritaria, para aquellos pacientes tratados previamente con la terapia T-CAR-BCMA.<sup>40,52</sup>

## **Otras alternativas de inmunoterapia en el MM**

---

### **➤ Otras terapias celulares adoptivas**

Las células NK también se presentan como un aliado en la terapia del cáncer. Su papel no se basa en la restricción a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, major histocompatibility complex) o reconocimiento de antígeno, sino que su actividad depende del equilibrio entre la presencia de receptores activadores y los inhibidores. En el MM la cantidad y la funcionalidad de las células NK están generalmente alterados, por lo tanto es factible pensar que la restauración del número de estas células con terapia de aceptación y compromiso (ACT: Acceptance and Commitment Therapy) podría representar una alternativa en el tratamiento de esta enfermedad.<sup>53</sup>

Hay muchas opciones terapéuticas que están actualmente bajo evaluación clínica, las cuales se diferencian principalmente en su origen (cordón umbilical frente a sangre periférica), en su aloreactividad (autóloga vs. alogénico), así como en los protocolos de expansión y estimulación utilizados para multiplicar mejor estas células.

Como conclusión de todos estos estudios se puede observar la elevada capacidad de las células NK alo-reativas para atacar a células malignas del MM, sin embargo su uso como células CAR NK en MM, todavía está bajo estudio preclínico. Como quimioterapia la lenalidomida <sup>54</sup> ha demostrado mejorar la función y persistencia de las células T CAR y junto al Carfilzomib <sup>55</sup> muestran actividades de activación y sensibilización sobre las células NK y células MM, respectivamente. <sup>56</sup>

#### ➤ **Terapia dirigida: Anticuerpos monoclonales**

Aunque los anticuerpos monoclonales han estado en el arsenal terapéutico desde hace algunos años para el tratamiento efectivo de algunos cánceres sólidos y hematológicos, no fue hasta hace tan solo unos años cuando se aprobó el fármaco daratumumab para el tratamiento de MM. Daratumumab es un anticuerpo monoclonal que se dirige selectivamente frente a la molécula CD38, la cual es un antígeno altamente expresado en las células plasmáticas malignas y sus niveles son relativamente bajos en células linfoides normales y en células mieloides. Del mismo modo, otros anticuerpos monoclonales anti-CD38 están actualmente bajo investigación tales como isatuximab y MOR22. Como agente único, daratumumab demostró una eficacia prometedora, observando tasas de respuesta objetivas (ORR) de aproximadamente el 30%, supervivencia libre de progresión (SLP) de 4 meses y supervivencia global (SG) de 20 meses, en recaída y pacientes refractarios de MM que recibieron un tratamiento intenso con al menos dos líneas previas de terapia. <sup>57,58,59</sup>

Este monoclonal ha sido capaz de matar las células MM a través de una gran cantidad de mecanismos que van desde la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por células NK, citotoxicidad mediada por componentes del complemento, fagocitosis dependiente de anticuerpos mediada por macrófagos e incluso a través de mecanismo de apoptosis. La citotoxicidad mediada por células NK parece ser uno de los principales mecanismos, y dependiendo del paciente el estado de estas células puede variar, lo que explicaría las diferencias respuestas observadas entre los pacientes. Otro anticuerpo monoclonal aprobado en la terapia del MM, es el elotuzumab, el cual reconoce a la molécula SLAMF7 expresada en las células T y NK del mieloma múltiple. El mecanismo de acción del elotuzumab difiere del de daratumumab, debido al hecho de que el elotuzumab por sí solo no alcanzó las tasas de respuestas objetivas pero combinado con lenalidomida y dexametasona, en un ensayo de fase II y después en el ensayo de fase III de Eloquent-2, se observaron ORR significativamente mejorados. <sup>57,58</sup>

La combinación de quimioterapia podría producir efectos sinérgicos y mejorar los resultados del paciente. Curiosamente, los inmunomoduladores han demostrado que llevan a las líneas celulares MM a la muerte celular mediada por células NK inducida por daratumumab. De hecho, varios ensayos clínicos que combinan inmunomoduladores y daratumumab han mostrado buenos resultados. Del mismo modo, la eficacia de daratumumab solo se mejoró con la combinación regímenes de daratumumab más lenalidomida y dexametasona o daratumumab con bortezomib más dexametasona. <sup>59</sup>



## Conclusiones

- 1- El Mieloma Múltiple es una enfermedad maligna **de difícil curación**, por lo que en la actualidad se están realizando continuas búsquedas de nuevas terapias eficaces
- 2- El éxito de la terapia T-CAR frente a leucemia y diferentes linfomas, es la principal razón de los actuales esfuerzos para su uso en el tratamiento el Mieloma Múltiple.
- 3- Para evitar la toxicidad del tratamiento es necesario realizar una selección del antígeno diana el cual debe expresarse únicamente en las células del MM,.
- 4- De entre las diferentes dianas que se han evaluado para el tratamiento del MM, el BCMA es la que ha resultado más prometedora, sin embargo, debido a la gran incidencia de recurrencias en esta enfermedad, es imprescindible contar con otras dianas, tales como por GPRC5D.
- 5- La terapia T-CAR, asociada a la quimioterapia y el trasplante de médula ósea podría suponer la cura definitiva del MM.

## Bibliografía

- 1- S. Vincent Rajkumar, M.D. and Shaji Kumar, M.D. Proc Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. Mayo Clin. 2016 Jan; 91(1): 101–119.
- 2- Guttrie, G. Inmunoterapia de células T con CAR: el avance del año 2018. Avances clínicos en Oncología. Journal of Clinical Oncology, 2018.
- 3- Susanibar Adaniya SP, Cohen AD, Garfall AL. Am J Hematol.; Chimeric antigen receptor T cell immunotherapy for multiple myeloma: A review of current data and potential clinical applications. 2019 May;94(S1):S28-S33.
- 4- Miliotou AN, Papadopoulou LC: CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. Curr Pharm Biotechnol. 2018;19(1):5-18
- 5- Grigor EJM, Fergusson D, Kekre N, Montroy J, Atkins H, Seftel MD, Daugaard M, Presseau J, Thavorn K, Hutton B, Holt RA<sup>1</sup>, Lalu MM. Risks and Benefits of Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR-T) Therapy in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Transfus Med Rev. 2019 Feb 14. pii: S0887-7963
- 6- Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. Sci Transl Med. 2011 Aug 10.3(95):95ra73.
- 7- Porter DL, Hwang WT, Frey NV, Lacey SF, Shaw PA, Loren AW, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. Sci Transl Med. 2015 Sep 2.7(303):303ra139.
- 8- Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. Sci Transl Med. 2013 Mar 20.5(177):177ra38.
- 9- Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. N Engl J Med. 2013 Apr 18; 368(16):1509–18. [PubMed: 23527958]
- 10- Lekha Mikkilineni, James N. Kochenderfer. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for multiple myeloma. Blood Journal. March 6, 2019
- 11- Kochenderfer JN, Rosenberg SA. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. Nat Rev Clin Oncol. 2013;10(5):267-276.
- 12- Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. Cancer Discov. 2013;3(4):388-398.
- 13- Van der Stegen SJ, Hamieh M, Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. Nat Rev Drug Discov. 2015; 14(7):499-509.
- 14- Jensen MC, Riddell SR. Designing chimeric antigen receptors to effectively and safely target tumors. Curr Opin Immunol. 2015;33:9-15.
- 15- Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. Mol Ther. 2009 Aug; 17(8):1453–64. [PubMed: 19384291]
- 16- Carpenito C, Milone MC, Hassan R, Simonet JC, Lakhani M, Suhoski MM, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Mar 3; 106(9):3360–5. [PubMed: 19211796]
- 17- Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigenreceptor-transduced T cells. Blood. 2012; 119(12):2709-2720.

- 18- Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 2013;5(177):177ra138
- 19- Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther.* 2010 Apr; 18(4):843–51. Epub 2010/02/25. eng. [PubMed: 20179677]
- 20- Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, Mahendravada A, Zhang M, Vera J, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia.* 2010 Jun; 24(6):1160–70. Epub 2010/04/30. eng. [PubMed: 20428207]
- 21- Minagawa K, Jamil MO, Al-Obaidi M, Pereboeva L, Salzman D, Erba HP, et al. In Vitro Pre-Clinical Validation of Suicide Gene Modified Anti-CD33 Redirected Chimeric Antigen Receptor T-Cells for Acute Myeloid Leukemia. *PLoS One.* 2016; 11(12):e0166891. [PubMed: 27907031]
- 22- Moon EK, Carpenito C, Sun J, Wang LC, Kapoor V, Predina J, et al. Expression of a functional CCR2 receptor enhances tumor localization and tumor eradication by retargeted human T cells expressing a mesothelin-specific chimeric antibody receptor. *Clin Cancer Res.* 2011 Jul 15; 17(14):4719–30. [PubMed: 21610146]
- 23- Craddock JA, Lu A, Bear A, Pule M, Brenner MK, Rooney CM, et al. Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. *J Immunother.* 2010 Oct; 33(8):780–8. [PubMed: 20842059]
- 24- Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med.* 2013 Dec 11.5(215):215ra172
- 25- Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood.* 2014 Jul 10; 124(2):188–95. [PubMed: 24876563]
- 26- Tembhare PR, Yuan CM, Venzon D, Braylan R, Korde N, Manasanch E, et al. Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases. *Leuk Res.* 2014 Mar; 38(3):371–6. [PubMed: 24462038]
- 27- Hajek R, Okubote SA, Svachova H. Myeloma stem cell concepts, heterogeneity and plasticity of multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2013 Dec; 163(5):551–64. [PubMed: 24111932]
- 28- Garfall AL, Maus MV, Hwang WT, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2015 Sep 10; 373(11):1040–7. Important paper presenting results from a clinical trial with a patient treated for multiple myeloma with CD19 CAR T cells. [PubMed: 26352815]
- 29- O'Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS. CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2004;121(2):254-263.
- 30- Kawano Y, Fujiwara S, Wada N, et al. Multiple myeloma cells expressing low levels of CD138 have an immature phenotype and reduced sensitivity to lenalidomide. *Int J Oncol.* 2012; 41(3):876-884.
- 31- Guo B, Chen M, Han Q, et al. CD138-directed adoptive immunotherapy of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells for multiplemyeloma. *J Cell Immunother.* 2016;2(1):28-35

- 32- Ramos CA, Savoldo B, Torrano V, Ballard B, Zhang H, Dakhova O, et al. Clinical responses with T lymphocytes targeting malignancy-associated kappa light chains. *J Clin Invest.* 2016 Jul 1; 126(7):2588–96. Results from a clinical trial using CAR T cells directed against  $\kappa$  light chain as treatment of multiple myeloma. [PubMed: 27270177]
- 33- Garfall AL, Lancaster E, Stadtmauer EA, Lacey SF, Dengel K, Ambrose DE, et al. Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome (PRES) after Infusion of Anti-Bcma CAR T Cells (CART-BCMA) for Multiple Myeloma: Successful Treatment with Cyclophosphamide. *Blood.* 2016; 128(22):5702.
- 34- Berdeja, JGYL., Raje, N., Siegel, D., Munshi, N., Turka, A., Lam, LP., Quigley, MT., Kochenderfer, JN. Clinical remissions and limited toxicity in a first-in-human multicenter study of bb2121, a novel anti-BCMA CAR T cell therapy for relapsed/refractory multiple myeloma; Annual Meeting of the EORTC/NCI/AACR; December 1, 2016; Munich, Germany. 2016.
- 35- Ali SA, Shi V, Maric I, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood.* 2016;128(13):1688-1700.
- 36- Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(8): 2048-2060.
- 37- Novak AJ, Darce JR, Arendt BK, et al. Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood.* 2004;103(2):689-694.
- 38- Kochenderfer JN, Somerville RPT, Lu T, et al. Lymphoma remissions caused by anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells are associated with high serum interleukin-15 levels. *J Clin Oncol.* 2017;35(16):1803-1813.
- 39- Lee JC, Hayman E, Pegram HJ, et al. In vivo inhibition of human CD19-targeted effector T cells by natural T regulatory cells in a xenotransplant murine model of B cell malignancy. *Cancer Res.* 2011;71(8): 2871-2881.
- 40- Eric L. Smith<sup>1,2</sup>, Kim Harrington<sup>3</sup>, Mette Staehr<sup>1</sup>, Reed Masakayan<sup>1</sup>, Jon Jones<sup>3</sup>, Thomas J. Long<sup>3</sup>, Khong Y. Ng<sup>4</sup>, Majid Ghodusi<sup>3</sup>, Terence J. Purdon<sup>1</sup>, Xiuyan Wang<sup>5</sup>, Trevor Do<sup>3</sup>, Minh Thu Pham<sup>3</sup>, Jessica M. Brown<sup>3</sup>, Carlos Fernandez De Larrea<sup>1</sup>: GPRC5D is a target for the immunotherapy of multiple myeloma with rationally designed CAR T cells. Smith *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 11, eaau7746 (2019) 27 March 2019.
- 41- Y. Gao, X. Wang, H. Yan, J. Zeng, S. Ma, Y. Niu, G. Zhou, Y. Jiang, Y. Chen, M. Zhang, Comparative transcriptome analysis of fetal skin reveals key genes related to hair follicle morphogenesis in cashmere goats. *PLOS ONE* 11, e0151118 (2016).
- 42- S. Inoue, T. Nambu, T. Shimomura, The RAIG family member, GPRC5D, is associated with hard-keratinized structures. *J. Invest. Dermatol.* 122, 565–573 (2004).
- 43- Y.-J. Kim, B. Yoon, K. Han, B. C. Park, Comprehensive transcriptome profiling of balding and non-balding scalps in trichorhinophalangeal syndrome type I patient. *Ann. Dermatol.* 29, 597–601 (2017).
- 44- R. Paus, B. J. Nickoloff, T. Ito, A ‘hairy’ privilege. *Trends Immunol.* 26, 32–40 (2005).
- 45- H. Ludwig, H. Gisslinger, U. Jaeger, A. Gaiger, Overexpression of G protein-coupled receptor 5D in the bone marrow is associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma. *Eur. J. Clin. Investig.* 42, 953–960 (2012).
- 46- Y. Cohen, O. Gutwein, O. Garach-Jehoshua, A. Bar-Haim, A. Kornberg, GPRC5D is a promising marker for monitoring the tumor load and to target multiple myeloma cells. *Hematology* 18, 348–351 (2013).

- 47- I. Frigyesi, J. Adolfsson, M. Ali, M. K. Christophersen, E. Johnsson, I. Turesson, U. Gullberg, M. Hansson, B. Nilsson, Robust isolation of malignant plasma cells in multiple myeloma. *Blood* 123, 1336–1340 (2014).
- 48- M. Hudecek, D. Sommermeyer, P. L. Kosasih, A. Silva-Benedict, L. Liu, C. Rader, M. C. Jensen, S. R. Riddell, The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer Immunol. Res.* 3, 125–135 (2015).
- 49- D. Gomes-Silva, M. Mukherjee, M. Srinivasan, G. Krenciute, O. Dakhova, Y. Zheng, J. M. S. Cabral, C. M. Rooney, J. S. Orange, M. K. Brenner, M. Mamonkin, Tonic 4-1BB costimulation in chimeric antigen receptors impedes T cell survival and is vector-dependent. *Cell Rep.* 21, 17–26 (2017).
- 50- A. H. Long, W. M. Haso, J. F. Shern, K. M. Wanhainen, M. Murgai, M. Ingaramo, J. P. Smith, A. J. Walker, M. E. Kohler, V. R. Venkateshwara, R. N. Kaplan, G. H. Patterson, T. J. Fry, R. J. Orentas, C. L. Mackall, 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat. Med.* 21, 581–590 (2015).
- 51- N. Watanabe, P. Bajgain, S. Sukumaran, S. Ansari, H. E. Heslop, C. M. Rooney, M. K. Brenner, A. M. Leen, J. F. Vera, Fine-tuning the CAR spacer improves T-cell potency. *Oncoimmunology* 5, e1253656 (2016).
- 52- J. F. Ashouri, A. Weiss, Endogenous Nur77 is a specific indicator of antigen receptor signaling in human T and B cells. *J. Immunol.* 198, 657–668 (2017).
- 53- Fionda, C., Stabile, H., Molfetta, R., Soriani, A., Bernardini, G., Zingoni, A., et al. (2018). Translating the anti-myeloma activity of Natural Killer cells into clinical application. *Cancer Treat. Rev.* 70, 255–264. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.10.005
- 54- Wang, X., Walter, M., Urak, R., Weng, L., Huynh, C., Lim, L., et al. (2018). Lenalidomide enhances the function of CS1 chimeric antigen receptor–redirected T cells against multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* 24, 106–119. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0344
- 55- Chang, S. K., Hou, J., Chen, G. G., Yu, D. D., Wu, H. Q., Xie, Y. S., et al. (2018). Carfilzomib combined with ex vivo-expanded patient autologous natural killer cells for myeloma immunotherapy. *Neoplasia* 65, 720–729. doi: 10.4149/neo\_2018\_171019N668
- 56- Sanchez-Martinez, D., Allende-Vega, N., Orecchioni, S., Talarico, G., Cornillon, A., Vo, D. N., et al. (2018). Expansion of allogeneic NK cells with efficient antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors. *Theranostics* 8, 3856–3869. doi: 10.7150/thno.25149
- 57- Lokhorst, H. M., Plesner, T., Laubach, J. P., Nahi, H., Gimsing, P., Hansson, M., et al. (2015). Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 373, 1207–1219. doi: 10.1056/NEJMoa1506348
- 58- Van de Donk, N. W. C. J., and Usmani, S. Z. (2018). CD38 antibodies in multiple myeloma: mechanisms of action and modes of resistance. *Front. Immunol.* 9:2134. doi: 10.3389/fimmu.2018.02134
- 59- Gavriatopoulou, M., Kastiris, E., Ntanasis-Stathopoulos, I., Fotiou, D., Roussou, M., Migkou, M., et al. (2018). The addition of IMiDs for patients with daratumumab-refractory multiple myeloma can overcome refractoriness to both agents. *Blood* 131, 464–467. doi: 10.1182/blood-2017-10-809293